

ERKENNUNG VON TRANSPLANTATIONSANTIGENEN
UND MOLEKULARGENETISCH SYNTHETISIERTEN
ANTIGENSEGMENTEN
DURCH T-LYMPHOZYTEN UND MONOKLONALE ANTIKÖRPER

Gerhild Wildner

München, 1987

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0072

**ERKENNUNG VON TRANSPLANTATIONSANTIGENEN
UND MOLEKULARGENETISCH SYNTHETISIERTEN ANTIGENSEGMENTEN
DURCH T-LYMPHOZYTEN UND MONOKLONALE ANTIKÖRPER**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für
Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**vorgelegt von
Gerhild Wildner
aus Graz (Österreich)**

München, 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Gutensohn
Sondergutachter: Prof. Dr. G. Riehmüller
Tag der mündlichen Prüfung: 17. November 1987

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung	1
II	Die Frage der Erbschaft	2
III	Die Erbschaftssteuer	3
IV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	4
V	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	5
VI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	6
VII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	7
VIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	8
IX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	9
X	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	10
XI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	11
XII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	12
XIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	13
XIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	14
XV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	15
XVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	16
XVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	17
XVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	18
XIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	19
XX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	20
XXI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	21
XXII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	22
XXIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	23
XXIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	24
XXV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	25
XXVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	26
XXVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	27
XXVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	28
XXIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	29
XXX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	30
XXXI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	31
XXXII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	32
XXXIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	33
XXXIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	34
XXXV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	35
XXXVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	36
XXXVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	37
XXXVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	38
XXXIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	39
XL	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	40
XLI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	41
XLII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	42
XLIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	43
XLIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	44
XLV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	45
XLVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	46
XLVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	47
XLVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	48
XLIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	49
L	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	50
LI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	51
LII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	52
LIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	53
LIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	54
LV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	55
LVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	56
LVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	57
LVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	58
LIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	59
LX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	60
LXI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	61
LXII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	62
LXIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	63
LXIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	64
LXV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	65
LXVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	66
LXVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	67
LXVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	68
LXIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	69
LXX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	70
LXXI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	71
LXXII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	72
LXXIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	73
LXXIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	74
LXXV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	75
LXXVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	76
LXXVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	77
LXXVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	78
LXXIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	79
LXXX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	80
LXXXI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	81
LXXXII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	82
LXXXIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	83
LXXXIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	84
LXXXV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	85
LXXXVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	86
LXXXVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	87
LXXXVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	88
LXXXIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	89
LXXXX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	90
LXXXXI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	91
LXXXXII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	92
LXXXXIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	93
LXXXXIV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	94
LXXXXV	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	95
LXXXXVI	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	96
LXXXXVII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	97
LXXXXVIII	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	98
LXXXXIX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	99
LXXXXX	Die Erbschaftssteuer nach dem Gesetz	100

Meinem Mann und
meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.	EINLEITUNG	2
1.1.	Der T-Zell-Antigenrezeptor	3
1.2.	Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)	6
1.3.	MHC-restringierte Antigenerkennung durch T-Zellen	8
1.4.	Aufgaben- und Fragestellung	10
2.	ERGEBNISSE	12
2.1.	Klonierung der B27-cDNS in Expressionsvektoren	12
2.1.1.	Klonierung in den Expressionsvektor pEx1	12
2.1.2.	Umklonierung in den Expressionsvektor pEx10	14
2.1.3.	Umklonierung in den Expressionsvektor pPLcAT10	15
2.1.4.	Bestimmung der DNS-Sequenz am jeweiligen 3'-Ende der Konstrukte	17
2.1.5.	Herstellung der Fusionsproteine	18
2.2.	Monoklonale Antikörper gegen Fusionsproteine	20
2.2.1.	Herstellung der monoklonalen Antikörper	20
2.2.2.	Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper	21
2.2.3.	Bindungstest der monoklonalen Antikörper auf den Fusionsproteinen	21
2.2.4.	Zelluläre Präsentation von Fusionsproteinen und Erkennung durch monoklonale Antikörper	23
2.2.5.	Oberflächen-Immunfluoreszenz auf HLA-Kl.I- tragenden Zellen	26
2.2.6.	Western Blot	28
2.2.7.	Isoelektrische Fokussierung	29
2.3.	Zelluläre Erkennung von Fusionsproteinen	31
2.3.1.	Stimulation von T-Helfer-Zellen	31
2.3.1.1.	T-Helfer-Zellen: Experiment 1	32
2.3.1.2.	T-Helfer-Zellen: Experiment 2	33
2.3.2.	Stimulation von zytotoxischen T-Zellen mit Fusionsproteinen	35
2.3.2.1.	Experiment 1	35
2.3.2.2.	Experiment 2	36
2.3.2.3.	Experiment 3	38
2.3.2.4.	Experiment 4	39
2.3.3.	Stimulation von zytotoxischen T-Zellen mit Bakterienlysaten	40
2.3.4.	Inhibition der B27-Zytotoxizität mit Fusionsproteinen	43

3.	DISKUSSION	46
3.1.	Diskussion der molekularbiologischen Arbeiten und der Fusionsproteine	46
3.2.	Monoklonale Antikörper gegen Fusionsproteine: Diskussion der Bindungsspezifitäten	47
3.3.	Fusionsproteine als Antigene für T-Zellen	49
4.	MATERIAL UND METHODEN	54
4.1.	Molekularbiologische Arbeiten	54
4.1.1.	Material	54
4.1.1.1.	Abkürzungen	54
4.1.1.2.	Chemikalien	55
4.1.1.3.	Radiochemikalien	55
4.1.1.4.	Enzyme	56
4.1.1.5.	Vektoren	56
4.1.1.6.	Bakterienstämme	56
4.1.1.7.	Fotomaterialien	57
4.1.1.8.	Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen	57
4.1.2.	Methoden	59
4.1.2.1.	Herstellung kompetenter Bakterienstämme	59
4.1.2.2.	Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien	60
4.1.2.3.	Präparation der Plasmid-DNS	61
4.1.2.3.1.	Kleinsatz	61
4.1.2.3.2.	Großansatz	61
4.1.2.4.	Phenolisieren der DNS	62
4.1.2.5.	Verdau der DNS mit Restriktionsenzymen	62
4.1.2.6.	Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten	63
4.1.2.7.	Elektroelution der DNS-Fragmente	63
4.1.2.8.	Auffüllreaktion	63
4.1.2.9.	Ligation	64
4.1.2.10.	DNS-Sequenziermethode nach Sanger	64
4.1.2.10.1.	Subklonieren in M13-Phagen	64
4.1.2.10.2.	Kompetenzinduktion beim E.coli Stamm JM101	64
4.1.2.10.3.	Transformation	65
4.1.2.10.4.	Selektion von Transformanten auf rekomb. DNS	65
4.1.2.10.5.	Isolierung von M13-Einzelstrang-DNS	65
4.1.2.10.6.	Bindung des M13-Primers an die ss-DNS	66
4.1.2.10.7.	Sequenzierreaktion	66
4.1.2.10.8.	Sequenziergel	67
4.1.2.11.	Induktion und Reinigung von Fusionsproteinen	67

4.2.	Biochemische Arbeiten	69
4.2.1.	Material	69
4.2.1.1.	Abkürzungen	69
4.2.1.2.	Chemikalien	69
4.2.1.3.	Radiochemikalien	70
4.2.1.4.	Häufig verwendete Puffer	70
4.2.1.5.	Verwendete monoklonale Maus-Antikörper	70
4.2.2.	Methoden	71
4.2.2.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	71
4.2.2.2.	Kovalente Kupplung von Immunglobulinen an Protein A-Sepharose	72
4.2.2.3.	Herstellung eines Zell-Lysates	73
4.2.2.4.	Immunpräzipitation der Membranantigene	73
4.2.2.5.	Western Blot	74
4.2.2.6.	Radioimmunpräzipitation	75
4.2.2.7.	Isoelektrische Fokussierung	76
4.2.2.8.	Ouchterlony-Immundiffusion	78
4.2.2.9.	ELISA:Enzymgekuppelter Immunosorbent-Test	79
4.3.	Zelluläre Arbeiten	80
4.3.1.	Material	80
4.3.1.1.	Abkürzungen	80
4.3.1.2.	Material und Geräte	81
4.3.1.3.	Radiochemikalien	81
4.3.1.4.	Zelllinien	81
4.3.1.4.1	HLA-Typisierung der verwendeten Linien und PBL	82
4.3.1.5.	Häufig verwendete Medien	83
4.3.1.6.	Verwendete monoklonale Maus-Antikörper	83
4.3.2.	Methoden	84
4.3.2.1.	Immunisierung der Mäuse	84
4.3.2.2.	Fusion der Maus-Milzzellen mit X63 Ag8.653	84
4.3.2.3.	Klonierung	85
4.3.2.4.	Immunfluoreszenz	85
4.3.2.5.	Gewinnung von Humanseren	86
4.3.2.6.	Präparation lymphoider Zellen	86
4.3.2.7.	Herstellung von PHA-Blasten	86
4.3.2.8.	Etablierung EBV-transformierter B-Zelllinien	86
4.3.2.9.	Isolation von APC aus Blutgerinnsel	87
4.3.2.10.	Präsentation von Fusionsproteinen	87

4.3.2.11.	Gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC)	
	Autologe Lymphozyten-Kultur (AMLC)	87
4.3.2.12.	Markierung von Zellen mit ^{51}Cr	88
4.3.2.13.	Der Zellvermittelte Zytotoxizitätstest (CML)	88
4.3.2.14.	IL-2-Proliferationstest und ^3H -Thymidinmarkierung	88
4.3.2.15.	Ernten der Zellen und Messen der eingebauten Radioaktivität	89
LITERATURVERZEICHNIS		90
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN		99
DANKSAGUNG		100
LEBENS LAUF		101

ZUSAMMENFASSUNG

Antigenrezeptoren auf T-Lymphozyten und Immunglobuline der B-Lymphozyten erkennen unterschiedliche Determinanten und Konformationen von MHC-Antigenen. Um diese Unterschiede weiter zu analysieren, wurde das HLA-Klasse I-Antigen B27 gentechnologisch über die cDNS in seine Domänen zerlegt und in Bakterien in Form von Fusionsproteinen mit β Galaktosidase bzw. MS2-Polymerase exprimiert.

Die Fusionsproteine wurden einerseits als Antigene zur Herstellung monoklonaler Antikörper, andererseits als Antigene für T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen eingesetzt. Dabei sollte eine B27-spezifische Alloreaktion der T-Zellen induziert werden.

Es wurden 6 monoklonale Antikörper isoliert, von denen 5 Fusionsproteine erkennen und einer ein bisher unbekanntes Bakterienantigen, das ein Merkmal in allen getesteten Fusionsproteinpräparationen ist. Die induzierten Antikörper erkennen keine nativen HLA-Antigene auf Zelloberflächen, präzipitieren jedoch HLA-Antigene aus Zell-Lysaten, wie sich am Beispiel von HLA-A2, B27 und Cw1 zeigen läßt.

Bei der Reaktion von T-Helfer-Zellen zeigte sich nach Stimulation mit den verschiedenen Fusionsproteinen eine bevorzugte Erkennung des Fusionsproteins, das die ersten beiden Domänen des B27-Antigens enthielt (D1/2). Nach Restimulation mit B27⁺ und B27⁻ Spenderzellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Immunantwort der D1/2-vorstimulierten T-Zellen auf die B27⁺ Stimulatorzellen.

Die Stimulation von zytotoxischen T-Zellen ergab, daß ein unbekanntes Bakterienantigen in allen Präparationen mit und ohne Fusionsprotein eine zwar nicht für B27, dennoch aber für HLA spezifische Immunantwort induzierte. Die HLA-Spezifität dieser zytotoxischen Zellen konnte durch vergleichende Lyse von Maus-Zellen mit und ohne humanem B27-Antigen auf der Oberfläche gezeigt werden. Die B27-spezifische Lyse einer dieser zytotoxischen T-Zelllinien konnte außerdem durch ein in allen Fusionsprotein-Fraktionen vorkommendes Bakterienprodukt dosisabhängig inhibiert werden.

In dieser Arbeit wurde die Problematik aufgezeigt, die beim Einsatz von Fusionsproteinen als Antigene für verschiedene Zellpopulationen auftritt. Ferner werden die unterschiedlichen Bedingungen der Antigenerkennung durch T- und B-Lymphozyten, die sich aus der Primärstruktur des Antigens selbst ergeben, demonstriert. Einen besonderen Aspekt stellt die Kreuzreaktion von MHC- und Bakterien-kodierten Antigenen dar, die sich aus den Stimulationsexperimenten mit T-Zellen und Antigenbindungsstudien mit den monoklonalen Antikörpern ergab. Die Bedeutung dieser Befunde für die MHC-restringierte Erkennung von Antigenen durch T-Lymphozyten wird eingehend diskutiert.



1. EINLEITUNG

Das Immunsystem der Vertebraten ist ein Organsystem, das den Organismus dazu befähigt, spezifisch auf körperfremde (antigene) Substanzen mit einer Abwehrreaktion zu reagieren. Es besteht hauptsächlich aus 3 Zelltypen, den B-Lymphozyten, den T-Lymphozyten und den Monozyten/Makrophagen (antigenpräsentierende Zellen). Nach den Effektorzellen läßt sich die Immunantwort in eine humorale und eine zelluläre Reaktion gliedern. Die humorale Reaktion wird von Lymphozyten getragen. Diese bzw. die sich aus ihnen entwickelnden Plasmazellen produzieren Antikörper, Proteine, die spezifisch an bestimmte komplementäre antigene Determinanten binden. Die Bindung der Antikörper an in den Organismus eingedrungene Fremdsubstanzen oder Zellen führt entweder zur Bildung von Komplexen, die von bestimmten Zellen des Systems aufgenommen und somit eliminiert werden, oder aber direkt zur Lyse der komplexierten Zellen mit Hilfe der Komponenten des Komplementsystems. Die Träger der zellulären Immunantwort sind die T-Lymphozyten, die je nach ihrer Funktion in Helfer- bzw. zytotoxische T-Zellen unterteilt werden. Ihre Differenzierung vollzieht sich im Thymus, wo sie auch die Unterscheidung zwischen ihren eigenen und fremden Oberflächenstrukturen, den HLA-Antigenen (Human Leukocyte Antigen), "lernen". T-Zellen erfüllen einerseits regulatorische Aufgaben, wie etwa die Induktion der Antikörperproduktion in B-Zellen, die vorwiegend über Mediatorsubstanzen, die sog. Lymphokine, erfolgt; andererseits sind sie auch in der Lage, virusinfizierte Zellen mit eigenen HLA-Antigenen sowie Zellen mit fremden HLA-Antigenen durch direkten Zellkontakt zu erkennen und zu eliminieren.

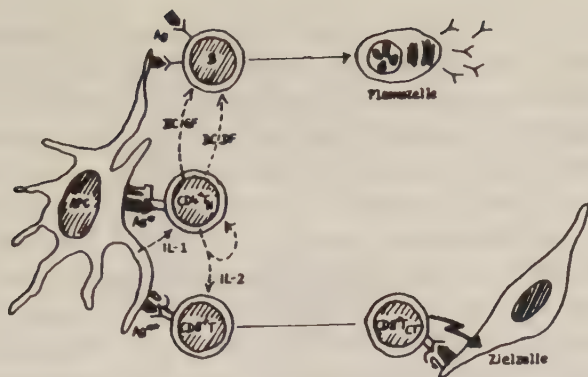


Abb.1: Zelluläre und humorale Interaktionen bei der Ausbildung einer Immunantwort (nach Rieber, 1986).

Abkürzungen:

- Ag : Antigen
- Ag^{*} : Antigen in Assoziation mit HLA-Klasse II
- Ag^{**} : Antigen in Assoziation mit HLA-Klasse I
- APC : Antigenpräsentierende Zelle
- B : B-Zelle
- IL-1, IL-2, BCGF, BCDF: Lymphokine
- T : T-Zelle
- T_H : T-Helferzelle
- T_{Cr} : zytotoxische T-Zelle.

1.1. Der T-Zell-Antigenrezeptor

Im Gegensatz zu den B-Zellen, die lösliches Antigen, das an ihren Immunglobulinrezeptor bindet, erkennen können, ist bei T-Zellen eine effektive Antigenerkennung nur in Verbindung mit MHC-Klasse I- bzw. Klasse II-Molekülen möglich.

Zwei Hauptmodelle der T-Zell-Antigenerkennung wurden diskutiert: einerseits die "Dual Recognition", die zwei getrennte, aber dennoch kooperierende Rezeptoren fordert (Blanden 1978), von denen der eine das Fremdanigen, der andere die Selbst-MHC-Struktur erkennt. Andererseits basierte auf der "Altered Self"-Hypothese (Zinkernagel 1974) die Annahme, daß Fremdanigen und MHC-Antigen unter Konformationsänderung des MHC-Moleküls einen Komplex bilden, der dadurch vom T-Zell-Rezeptor erkannt wird. Bei der Antigenpräsentation für T-Helferzellen wird das Antigen im Kontext mit MHC-Klasse II-Antigenen präsentiert, für die Antigenerkennung von zytotoxischen T-Zellen (z.B. Virusrestriktion) ist die Präsentation über Klasse I-Moleküle erforderlich (s. Abb.4).

Die molekularbiologischen Untersuchungen sind seither weit fortgeschritten, man hat herausgefunden, daß Fremdartigen und MHC mit einem einzigen T-Zell-Rezeptorkomplex interagieren, der sich aus verschiedenen funktionellen Molekülen zusammensetzt (Yagüe, 1986; Dembic', 1986). Der T-Zell-Rezeptor besteht aus der α -Kette (46-49 kD) und der β -Kette (38-44 kD) des klonotypischen Rezeptors T1 (α - und β -Kette sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden) (Meuer 1983), welcher eng mit dem CD3-Komplex, aus der γ , δ und ϵ - Kette bestehend (Gold, 1986), assoziiert ist. Die α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors können, vergleichbar mit den Immunglobulinen, nach erfolgreichem Rearrangement je eines V, D, J und C-Segments synthetisiert werden (Yanagi, 1984; Sims, 1984; Hedrick, 1984). Wie bei den Immunglobulinen entsteht die Variabilität der T-Zell-Rezeptorketten durch die Rekombination der einzelnen Gensegmente. Den CD3-Glykoproteinen wird die Rolle der Signalübertragung ins Zellinnere zugeschrieben, welche vom T1 antigenspezifisch gesteuert wird. Nach neuen Befunden wird auch die γ -Kette aus verschiedenen rearrangierten Gensegmenten gebildet, eine Notwendigkeit der γ -Kette bei der Antigen-spezifischen MHC-restringierten Immunantwort von Maus-Zytotoxischen T-Zellen konnte aber nicht gezeigt werden (Reilly, 1986; Rupp 1986).

An den T1-Komplex sind ferner das CD4- oder CD8-Molekül assoziiert. Sie sollen für die Erkennung monomorpher Determinanten auf MHC-Molekülen zuständig sein, CD4 für Klasse II und CD8 für Klasse I. Geklärt ist aber noch nicht, ob sie an die selben Klasse I- oder Klasse II-Moleküle binden, die dem T-Zell-Rezeptor das Antigen präsentieren, oder aber an benachbarte Moleküle. Die Antigen- und MHC-Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor funktioniert auch ohne die Bindung von CD4 (T4) oder CD8 (T8) an MHC-Moleküle, sie dienen offensichtlich nur der Stabilisation des Rezeptor-Antigen-MHC-Komplexes (Blackman 1986).

Eine exakte Korrelation zwischen Antigen-Bindung und MHC-Erkennung mit den α - oder β -Ketten des T-Zell-Rezeptors kann nicht gezeigt werden (Blackman 1986). Nach Fink (1986) hat V α Kontakte mit dem Antigen, die VDJ-Region der β -Kette aber soll die Feinspezifität gewährleisten. Antigen und MHC-Molekül können unabhängig voneinander an den T-Zell-Rezeptor binden, woraus man eine zweifache Spezifität des T-Zell-Rezeptors folgern kann (Ashwell 1986). T-Zell-Rezeptor, Antigen und MHC-Molekül bilden einen Dreierkomplex, bei dem jedes beteiligte Molekül mit jedem der beiden anderen interagiert.

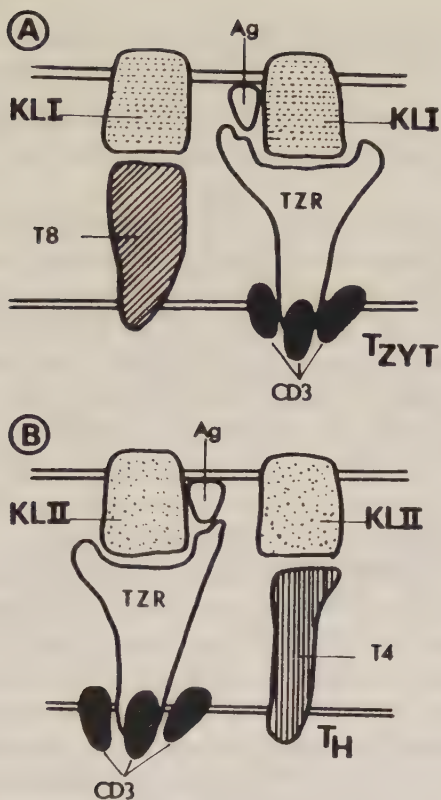


Abb.2: Modell der Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor
(nach Dembic' 1986)

(A) Antigenerkennung von zytotoxischen T-Zellen

(B) Antigenerkennung von T-Helfer-Zellen

Abkürzungen:

KL I : Klasse I-Molekül

KL II : Klasse II-Molekül

TZR : T-Zell-Rezeptor

T4 : CD4-Molekül

T8 : CD8-Molekül

CD3 : CD3-Moleküle

Ag : Antigen

T_{zyt} : Zytotoxische T-Zelle

T_H : Helfer-T-Zelle

1.2. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Die früher nur als Transplantationsantigene eingestuften MHC-Moleküle sind heute als Restriktionselemente für die Erkennung der T-Zellen von Selbst und Nicht-Selbst anzusehen.

Die Produkte des MHC-Komplexes wurden ursprünglich aufgrund von Transplantatabstoßungen erkannt. Die ersten Charakterisierungen erfolgten serologisch und über T-Zellen, erst später wurde auf molekularbiologischer Ebene die Lokalisation und Sequenz der Gene bestimmt. Der MHC-Komplex liegt beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (van Someren 1974), bei der Maus auf Chromosom 17 (Klein 1974). Funktionell und strukturell lassen sich die Produkte des MHC-Komplexes in drei Gruppen unterteilen. Außer den Molekülen der Klassen I, II und III liegen im MHC-Komplex noch das Gen für 21-Hydroxylase, einem Enzym des Steroidstoffwechsels (Amor 1985), und die Gene für TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor) und TNF β (Lymphotoxin) (Nedwin, 1985; Nedospasov, 1986; Müller, 1987).

Die Moleküle der Klasse III bilden die Komponenten des Komplementsystems, welche in Kooperation mit Antikörpern in der Lage sind, Zellen zu lysieren.

Bei den Klasse II-Antigenen handelt es sich um Glykoproteine, die aus zwei membranständigen, nicht kovalent miteinander verknüpften Ketten von 35kD (α) und 28kD (β) bestehen (Kratzin 1981). Ihre Expression ist gewebespezifisch und induzierbar, bei den Lymphozyten z.B. tragen nur Monozyten und B-Zellen Klasse II-Antigene. Sie spielen eine Rolle bei der Regulation der Immunantwort, da T-Helfer-Zellen ihr Antigen nur über Klasse II-Moleküle präsentiert erkennen können.

Die Antigene der Klasse I sind polymorphe Glykoproteine, die α -Kette von 44kD ist membranständig und nicht kovalent mit dem β 2-Mikroglobulin (12kD) assoziiert (Grey 1973), welches kaum polymorph ist und nicht im MHC kodiert wird. Die Klasse I-Antigene spielen die Hauptrolle bei der Transplantatabstoßung und können, von zytotoxischen T-Zellen erkannt, als Signal für die Zell-Lyse fungieren. Die eigentliche Funktion kommt ihnen bei der Abwehr virusinfizierter Zellen zu, in diesem Fall kann von zytotoxischen T-Zellen das Virusantigen ausschließlich zusammen mit den körpereigenen Klasse I-Antigenen erkannt und die infizierte Zelle eliminiert werden.

Das Klasse I-Molekül besteht aus einem extrazellulären, einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Teil. Der extrazelluläre Teil gliedert sich in drei Domänen (α 1-3) von je 90 Aminosäuren. Die für alle Klasse I-Moleküle charakteristische N-Glykosylierungsstelle liegt zwischen der 1. und 2. Domäne. An der Interaktion mit β 2-Mikroglobulin sind wahrscheinlich bevorzugt die α 1- und α 2-Domäne beteiligt (Strominger, Genf 1986), die wichtigsten Erkennungsdeterminanten für T-Zellen

werden in den ersten beiden Domänen vermutet. Der Transmembranteil umfaßt rund 40 vorwiegend hydrophobe Aminosäuren, der zytoplasmatische Anteil setzt sich aus ca. 27 hydrophilen Aminosäureresten zusammen.

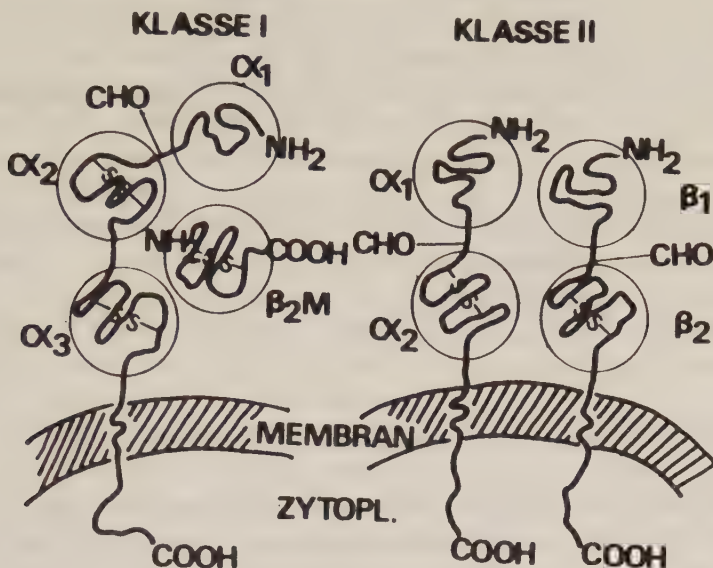


Abb.3: Schematische Darstellung der HLA-Klasse I und Klasse II-Moleküle in der Zellmembran (nach Coligan, 1981 und Hood, 1982, 1983).

- $\alpha_1, 2, 3$: 1., 2., und 3. Domäne der α -Ketten
- β_1 und β_2 : 1. und 2. Domäne der β -Kette
- β_2 M : β_2 Mikroglobulin
- NH_2 : Aminoterminus
- $COOH$: Carboxyterminus
- $-SS-$: Disulfidbrücken
- CHO : Glykosylierung

Die Gene der Klasse I-Moleküle sind in 8 Exons aufgeteilt, die durch Introns voneinander getrennt sind. Die Intron-Exon-Struktur spiegelt sich im Aufbau der Moleküle wider, das erste Exon kodiert für die 5'-flankierende Sequenz und die Signalsequenz, das zweite, dritte und vierte jeweils für die Domänen α_1 , α_2 und α_3 , Exon 5 für den Transmembranteil und Exon 6, 7 und 8 für den zytoplasmatischen Anteil und die 3'-nichttranslatierte Region.

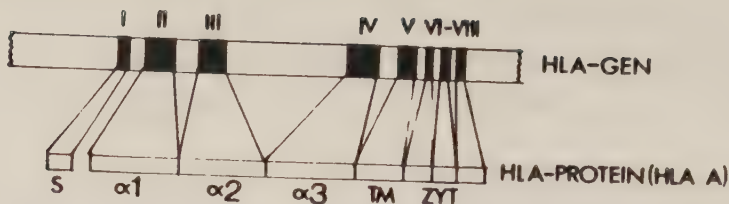


Abb.4: Exon-Intron-Struktur eines HLA-A-Gens und Übersetzung in Protein.

- I-VIII : Exons
- α1-α3 : Domänen 1-3
- S : Signalpeptid
- TM : Transmembrantell
- ZYT : zytoplasmatischer Teil.

1.3. MHC-restringierte Antigenerkennung durch T-Zellen

Die Antigene für die Stimulation von T-Zellen werden "prozessiert" präsentiert. Unter "Prozessierung" versteht man proteolytische Zerkleinerung und Denaturierung der nativen Antigene. Während man ursprünglich annahm, daß nur T-Helfer-Zellen degradierte Formen löslicher Proteinantigene (Peptide) im Kontext mit Klasse II-Molekülen erkennen und zytotoxische T-Zellen Klasse I zusammen mit Zelloberflächen-Antigenen wie z.B. Virusantigenen, weiß man inzwischen, daß Klasse I-restringierte T-Lymphozyten auch degradierte Antigene wie etwa Peptide erkennen können (Townsend 1986). Es werden also zusammen mit Klasse I-Molekülen nicht mehr nur intrazellulär produzierte Antigene wie Virusproteine, sondern auch von außen aufgenommene präsentiert (Bevan 1987). So könnten auch Fragmente allogeneischer Zellen aufgenommen und allo-MHC-Fragmente in prozessierter Form auf Selbst-MHC-Molekülen präsentiert werden.

Die Fähigkeit der Bindung des Antigens an das MHC-Molekül der Antigen-präsentierenden Zelle ist ein entscheidender Schritt der zellulären Immunantwort. Nicht alle Antigene binden mit gleicher Affinität an die Antigen-präsentierenden MHC-Moleküle, sodaß schon auf der Ebene der Antigenpräsentation die Immunantwort auf ein Antigen gesteuert wird (Rosenthal, 1977).

Klasse II-Moleküle scheinen nur eine Region für die Anlagerung des Antigens zu haben, was von Lakey (1986) und Guillet (1986) durch kompetitive Inhibitionsexperimente mit immunogenen Peptiden gezeigt wurde. Guillet et al postulieren, daß diese Antigenbindungsstelle in einer Region liegt, die bei allen MHC-Antigenen gleich ist und im Thymus als "selbst" erlernt wird, während die Aufgabe der Antigenbindungsstelle selbst darin besteht, das Antigen in eine unverkennbar einzulagern.

tige Position für die Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor zu bringen. Dieses Modell wäre zutreffend für die Antigenpräsentation mittels Klasse I und Klasse II-Molekülen.

Sherwood et al (1986) konnten zeigen, daß Sensibilisierung mit Alloantigen-präsentierenden syngenischen Zellen zu verstärkter Transplantatabstoßung führt. Demnach kann eine zytotoxische T-Zelle ein membranständiges allo-MHC-Antigen so wie ein prozessiertes, vom eigenen MHC präsentiertes Antigen sehen. Maryanski (1986a, 1986b) zeigte, daß ein für ein menschliches HLA-Antigen spezifischer Maus-zytotoxischer T-Zell-Klon das HLA-Antigen nur zusammen mit dem syngenischen H-2-Molekül erkennen kann, derselbe Klon lysierte auch syngene, ein HLA-Peptid präsentierende Zellen. In diesem Fall wird, da im xenogenen System gearbeitet wird, das MHC-Antigen wie ein Virusantigen, also wie ein Minor-Antigen, gehandhabt. Daß Peptide auch bei der Allo-Erkennung eine Rolle spielen, zeigt Parham (1987) mit der Inhibition einer allospezifischen T-Zell-vermittelten Lyse durch synthetische Peptide des entsprechenden Allo-MHC-Antigens.

Daß die Erkennung allospezifischer Determinanten Ähnlichkeiten mit virusrestringierter T-Zell-Erkennung hat, zeigen auch die Arbeiten von Finberg (1978) und Gaston (1983), in denen beschrieben wird, daß selbst-HLA-restringierte virusspezifische zytotoxische T-Zellen mit nicht Virus-infizierten allogenen Zellen kreuzreagieren.

Nach einer Hypothese von Kourilsky und Claevery (1986) sollen T-Zellen während der Ontogenese lernen, ein Set von Bruchstücken körpereigener Proteine auf Zelloberflächen als "somatisches Selbst" zu erkennen und nicht darauf zu reagieren, während alle Peptide, die nicht in das Set passen, als "nicht Selbst" erkannt werden.

Da gleiche Peptidsequenzen bei verschiedenen Molekülen häufiger vorkommen, ließe sich damit auch erklären, warum man mit einem relativ beschränkten T-Zell-Rezeptor-Repertoire, verglichen mit dem der Immunglobuline, auskommen kann. Ein Virus oder Bakterium kann nicht abgewehrt werden, wenn es in Form von Peptiden präsentiert wird, die dem somatischen Selbst gleichen, wodurch sich die Assoziation mancher Krankheiten mit bestimmten HLA-Typen erklären ließe. Andererseits könnten Fremd-MHC-Moleküle zu gleichen Peptiden degradiert werden wie etwa ein Virusprotein. Somit würde eine Alloerkennung entsprechend einer virusrestringierten Immunantwort ablaufen. Für dieses Modell wäre gefordert, daß alle MHC-Klasse I-Moleküle einer Spezies eine MHC-typische, einheitliche oder zumindest stark kreuzreaktive Determinante haben, die vom T-Zell-Rezeptor als restringierendes Element zusätzlich zum präsentierten Antigen erkannt wird (Guillet, 1987). Im Thymus werden dann die T-Zellen selektioniert, deren Rezeptoren jene Selbst-Determinante erkennen.

Viele Experimente bestätigen die Hypothese von Kourilsky, daß sich die zelluläre Immunantwort mehr auf Abbauprodukte in Form von Peptiden als auf komplexe dreidimensionale Moleküle konzentriert. Vor allem die Einführung synthetischer Peptide als Antigene hat auf dem Gebiet der zellulären Antigenerkennung in den letzten Jahren zu erheblichen Fortschritten geführt.

1.4. Aufgaben- und Fragestellungen

Zur besseren Untersuchung funktioneller oder allelspezifischer Determinanten wurde versucht, das MHC-Klasse I-Molekül HLA-B 27 weitgehend in seine drei extrazellulären Domänen zu zerlegen. Diese Aufspaltung erfolgte gentechnologisch auf der Ebene der cDNA (komplementäre DNA), einer exakten Kopie der mRNA, die keine Intronsequenzen enthält. Abschnitte dieser cDNA wurden mit Bakteriengenomen in Expressionsvektoren fusioniert. Sie konnten dann als sog. "Durchleseprodukte" zu einem Fusionsprotein, bestehend aus einem Bakterienprotein mit angehängtem menschlichem HLA-Molekülanteil, übersetzt werden.

Diese Fusionsproteine wurden als Immunogene für die Herstellung HLA-spezifischer monoklonaler Antikörper verwendet. Die Fusionsproteine repräsentieren isolierte Zelloberflächen-Antigene, sodaß man eine höhere spezifische Immunantwort durch Fusionsproteine als durch Immunisierung mit ganzen Zellen oder Zellfragmenten mit membranständigem Antigen erwartete. Man kann allerdings annehmen, daß die Struktur der Fusionsproteine nicht genau der des nativen, membranständigen HLA-Antigens entspricht. Daraus erhebt sich die Frage, ob die für Fusionsprotein spezifischen Antikörper das native Antigen überhaupt erkennen können oder ob sie nur an eine denaturierte Form binden. Ferner war zu klären, ob die Fusionsprotein-spezifischen Antikörper noch eine Spezifität für B27 haben oder mit monomorphen HLA-Determinanten reagieren, was durch Präzipitation von HLA-Antigenen gezeigt werden sollte. Durch Studien der Bindung an die einzelnen Fusionsproteine sollten die entsprechenden Epitope am HLA-Molekül ungefähr lokalisiert werden.

Weiterhin sollten die monoklonalen Antikörper zeigen, ob diese HLA-Epitope nach Inkubation der Fusionsproteine mit antigenpräsentierenden Zellen auf deren Zelloberfläche nachgewiesen werden können. Der Nachweis dieser Antigenpräsentation war Ausgangspunkt für die nachfolgenden Experimente zur Stimulation von T-Zellen.

Die Versuche zur Erkennung von Fusionsproteinen durch T-Zellen könnten zu weiteren Aussagen über die Antigenerkennung von T-Zellen im allgemeinen und die Erkennung von Allo-Antigenen im speziellen zulassen.

Die Beantwortung der Frage, ob durch die Fusionsproteine T-Zellen stimuliert werden können, erfolgte durch Präsentation von Fusionsproteinen auf antigenpräsen-

tierenden Zellen. Es sollte erforscht werden, ob die Fusionsproteine von T-Helfern und von zytotoxischen T-Zellen gleichermaßen erkannt werden. Mit Hilfe der Fusionsproteine sollte ebenfalls gezeigt werden können, welche Epitope des HLA-Antigens für T-Zellen besonders immunogen sind. Unterschiedliche Erkennungsregionen von T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen sollten Rückschlüsse auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire der beiden funktionell verschiedenen Zell-Populationen erlauben. Von besonderem Interesse war auch, ob die Stimulation B27-spezifisch ist oder ob eine unspezifische polyklonale Reaktion induziert wird. Letztlich müssen auch Vor- und Nachteile der Fusionsproteine diskutiert und die Frage beantwortet werden, ob Fusionsproteine ein optimales Werkzeug bei der Erforschung antigener Determinanten und deren Erkennung sind.

2. ERGEBNISSE

2.1. Klonierung der B27-cDNS in Expressionsvektoren

2.1.1. Klonierung in den Expressionsvektor pEX1

Der Expressionsvektor pEX1 (Stanley 1984) ermöglicht die Expression von Genabschnitten in Form von cDNS in Bakterien (Bakterien können eukaryontische Prä-mRNS nicht wie Eukaryonten spleißen und würden folglich Exons und Introns in Protein übersetzen) in einen Polylinker am 3'-Ende des β -Galaktosidasegens. Das von solchen Konstrukten abgelesene Proteinprodukt besteht aus einer Fusion der 116kD schweren β -Galaktosidase und des Polypeptids vom subklonierten Gensegment.

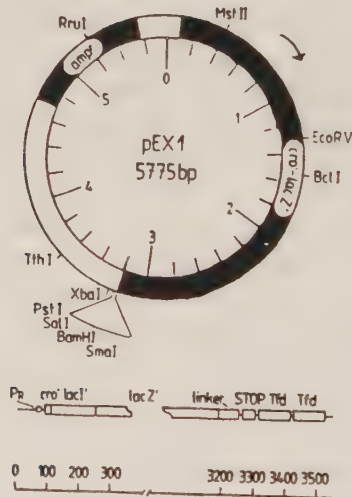


Abb.5: Genkarte des Vektors pEX1

Der Klon pB1 der B27-cDNS von H.Szöts (Szöts 1986) wurde mit Restriktionsenzymen so geschnitten, daß nach Möglichkeit die extrazellulären Exons (Domänen) vollständig erhalten blieben. Er beginnt im 2.Exon (1.Domäne) mit einer PstI-Schnittstelle, die der Aminosäureposition 29 entspricht und endet mit einer PstI-Schnittstelle am 3'-Ende des 3'-untranslatierten Teils (Exon 8).

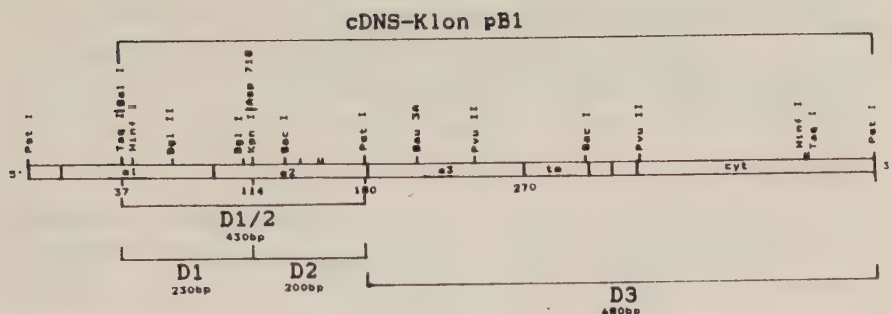


Abb.6: Restriktionskarte der B27-cDNS

D1/2, D1, D2, D3: B27-DNS-Abschnitte der einzelnen Fusionsproteine

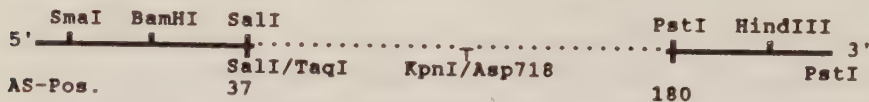
Die 3. Domäne wurde über eine PstI-Schnittstelle, die zwischen dem 3. und 4. Exon der cDNS bei Aminosäureposition 180 liegt, sowie über die PstI-Sequenz am 3'-Ende der cDNS in den Vektor pEx 1 kloniert. Bei Aminosäure-Position 274, am Ende der 3. Domäne, hat der verwendete cDNS-Klon ein Translationsstop-Kodon, sodaß bei der Translation zum Fusionsprotein die Transmembran- und cytoplasmatischen Anteile nicht synthetisiert wurden.

Die Expression von 1. und 2. Domäne allein erreichte man durch die Subklonierung des 5'TaqI/PstI-Fragments von pBl (D1/2) in den Vektor pEx1, geschnitten mit SalI/PstI (s.Abb.u.). Da pBl eine poly G-Sequenz am 5'-Ende enthält, konnte nicht die 5'-terminale PstI-Schnittstelle zum Umklonieren benutzt werden, weil das entsprechende Fusionsprotein viele Glycinreste enthalten würde. Die TaqI-Schnittstelle ist mit der resultierenden SalI-Sequenz identisch. Da zwischen den beiden Exons, die für die beiden ersten Domänen kodieren, keine geeignete Schnittstelle liegt, die mit einer Schnittstelle im Polylinker kompatibel wäre, wurde, ausgehend von dem ersten Konstrukt (D1/2) jeweils der Abschnitt zwischen SalI und Asp718 (D1, entspricht AS-Pos.37-114) und der Abschnitt zwischen Asp718 und PstI (D2, AS-Pos. 114-180) deletiert, die inkompatiblen Schnittstellen aufgefüllt und als glatte Enden ligiert. Die Auffüllreaktion von SalI (im Linker) und Asp718 in der cDNS führte zu keiner Verschiebung des Leserasters. KpnI und Asp718 haben identische Erkennungsregionen auf der DNS, Asp718 generiert aber das für die Auffüllreaktion wichtige 5'-überhängende Ende.

Polylinker des Expressionsvektors pEx1:

SmaI BamHI Sali PstI HindIII
 GCC CGG GGA TCC GTC GAC CTG CAG CCA AGC TTG CTG ATT GAT

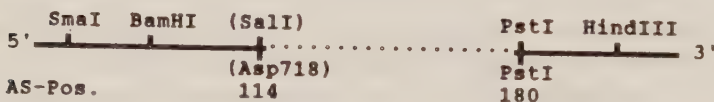
βGal-D1/2:



βGal-D1:



βGal-D2:



βGal-D3:



Abb.7: Schematische Darstellung der Subklonierung von B27-cDNS-Abschnitten in den Expressionsvektor pEx1

- Polylinker von pEx1
- ... B27-cDNS
- † gemeinsame Restriktionsenzymchnittstellen von Vektor und cDNS
- () durch Auffüllreaktionen deletierte Restriktionsenzym-Schnittstellen
- Translationsterminations-Kodon

2.1.2 Umklonierung in den Expressionsvektor pEx10

Um ein kleineres Fusionsprotein zu erhalten, wurden die B27-cDNS-Abschnitte aus dem Vektor pEx1 in pEx10 umkloniert. In pEx10 werden die klonierten DNS-Abschnitte an das Gen für die Phagen-Polymerase MS2 fusioniert. Die MS2-Polymerase hat ein Molekulargewicht von ca 11kD und somit ungefähr die gleiche Größe wie eine Domäne einer Klasse I-schweren Kette.

Alle Konstrukte wurden über die BamHI-Schnittstelle am 5'-Ende und die HindIII-Schnittstelle (3') aus pEx1 in pEx10 umklont. Die Ausnahme bildet das Konstrukt D1, bei dem die HindIII-Region durch die Auffüllreaktion zerstört ist. In diesem Fall wurde die XbaI-Region, die bei pEx1 3'außerhalb der Linkerregion liegt, genutzt.

Polylinker des Expressionsvektors pEx10:

EcoRI	BamHI	Sali	PstI	BlgII	XbaI	HindIII
CTG AAT TCC GGG GAT CCG TCG ACC TGC AGA TCT CTA GAA GCT T						

MS2-D1/2:

5' EcoRI BamHI Sali PstI HindIII
 ~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~ 3'  
                   Sali/TaqI KpnI/Asp718 PstI

#### MS2-D1:

5' EcoRI BamHI Sali (HindIII) XbaI HindIII  
 ~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~ 3'  
 Sali/TaqI (Asp718)

MS2-D2:

5' EcoRI BamHI (Sali) PstI HindIII
 ~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~ 3'  
                   (Asp718) PstI

#### MS2-D3:

5' EcoRI BamHI Sali PstI PstI HindIII  
 ~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~|~~~~~ 3'  
 PstI PstI

Abb.8: Schematische Darstellung der Umklonierung von B27-cDNS-Abschnitten aus dem pEx1 in den pEx10-Vektor

~~~ Polylinker von pEx10

— Polylinker von pEx1

... B27-cDNS

† gemeinsame Restriktionsenzym-Schnittstellen von Vektor und cDNS

() durch Auffüllreaktionen deletierte Schnittstellen

• Translationsterminations-Kodon

#### 2.1.3. Umklonierung in den Expressionsvektor pLcAT10

Der bakterielle Expressionsvektor pLcAT10 (Stanssens 1985) hat unmittelbar vor dem Polylinker einen Promotor, die Shine-Dalgarno-Sequenz (prokaryontische Ribo-



#### 2.1.4. Bestimmung der DNS-Sequenz am jeweiligen 5'Ende der Konstrukte

Um nachzuweisen, daß alle Auffüllreaktionen beim Umklonieren korrekt abgelaufen sind und sich das Leseraster nicht verschoben hat, wurden die Konstrukte nach der Methode von Sanger ansequenziert. Die Fragmente wurden über die EcoRI-Schnittstelle 5'des Startkodons in pPLcAT10 und die HindIII-Schnittstelle am 3'-Ende in den Phagen M13mp11 umkloniert. Die gelesenen Sequenzen wurden dann mit den erwarteten verglichen.

Die oberen Sequenzen sind immer die erwarteten, die unteren die tatsächlich erhaltenen.

##### D1/2:

```

    Asp Arg Ser Val Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg
ATG GAT CGA TCC GTC GAC AGC GAC GCC GCG AGT CCG AGA
    >>> B27

    Asp Arg Ser Val Asp Arg Asp Ala Ala Ser Pro Arg
ATG GAT CGA TCC GTC GAC CGC GAC GCC GCG AGT CCG AGA
    >>> * B27

```

##### D1:

```

    Asp Arg Ser Val Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg
ATG GAT CGA TCC GTC GAC AGC GAC GCC GCG AGT CCG AGA
    >>> B27

    Asp Arg Ser Val Asp Arg Asp Ala Ala Ser Pro Arg
ATG GAT CGA TCC GTC GAC CGC GAC GCC GCG AGT CCG AGA
    >>> * B27

```

##### D2:

```

    Asp Arg Ser Val Asp Tyr His Gln Glu Tyr
ATG GAT CGA TCC GTC GAC TAC CAC CAG GAG TAC
    >>> B27

    Asp Arg Ser Val Asp Tyr His Gln Glu Tyr
ATG GAT CGA TCC GTC GAC TAC CAC CAG GAG TAC
    >>> B27

```

##### D3:

```

    Asp Arg Ser Val Asp Leu Gln Arg Val Asp
ATG GAT CGA TCC GTC GAC CTG CAG CGC GTG GAC
    >>> B27

    Asp Arg Ser Val Asp Leu Gln Arg Val Asp
ATG GAT CGA TCC GTC GAC CTG CAG CGC GTG GAC
    >>> B27

```

1

Bis auf einen Basenaustausch von A nach C bei D1/2 und D1, der zu einem Aminosäureaustausch von Serin nach Arginin führt, wurden keine weiteren Mutationen gefunden. Das Leseraster war in keinem Fall verschoben, sodaß man von einer korrekten Synthese der Fusionsproteine ausgehen konnte.

#### 2.1.5. Herstellung der Fusionsproteine

Alle Konstrukte mit pEx1-Vektoren wurden im E.coli-Stamm pop vermehrt, die Konstrukte mit pEx10 und pPLcAT10 im E.coli-Stamm 537. Es wurden mindestens 5 Bakterienklone pro Konstrukt für eine Testinduktion aufgezogen. Nach dem Hitzeschock wurde nach 20Min., 1Std., und dann stündlich bis zu 4Std. jeweils eine Bakterienprobe entnommen, abzentrifugiert und das mit SDS gelöste Bakteriensediment auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Die Bakterienkolonie mit der jeweils besten Fusionsproteinsynthese wurde für den Großansatz der Fusionsproteinherstellung ausgewählt. Die MS2-Polymerase allein und die Domänen, die ohne bakterielles Fusionsprotein auf den pPLcAT10-Vektoren kodiert wurden, konnten nicht isoliert werden, da sie als lösliche Proteine wahrscheinlich sofort proteolytisch abgebaut wurden. (s. SDS-PAGE). Die Fraktion, die nach den Anreicherungs-schritten das Fusionsprotein enthielt, wurde ungeachtet der noch enthaltenen Bakterienproteine für die weiteren Experimente verwendet. Eine weitere Aufreinigung der Fusionsproteine, etwa durch gel- oder gaschromatographische Verfahren, hätte eine Solubilisierung der Fusionsproteine durch Detergentien erfordert, die nicht mehr restlos zu entfernen gewesen wären und toxische Effekte beim Einsatz in der Gewebekultur gehabt hätten.



Abb.10: 10% SDS-PAGE mit  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteinen

Die Fusionsproteine haben ein Molekulargewicht von ca 130 kD. (MW  $\beta$ Gal 116kD)

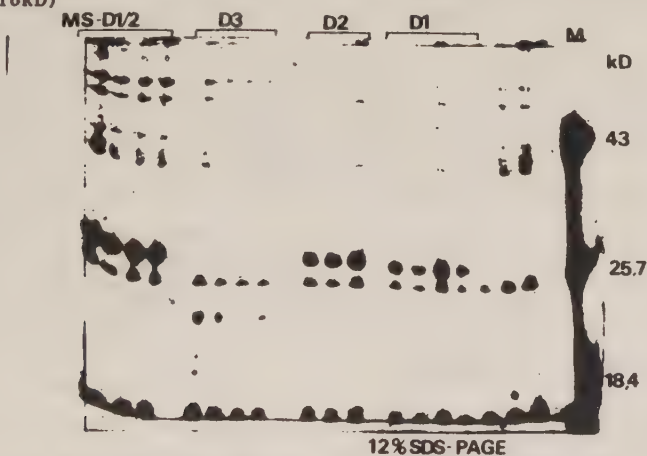


Abb.11: 12% SDS-PAGE mit MS2-Polymerase-Fusionsproteinen

Die Fusionsproteine haben ein Molekulargewicht zwischen ca. 20 und 30kD (MW MS2-Pol: 11kD)

## 2.2. Monoklonale Antikörper gegen Fusionsproteine

### 2.2.1. Herstellung der monoklonalen Antikörper

Zunächst wurde versucht, durch Immunisierung von Kaninchen und Mäusen mit  $\beta$ Galaktosidase-Fusionsproteinen ein polyklonales Serum bzw. monoklonale Maus-Antikörper mit Spezifität für B27 zu erhalten. Weder das polyklonale Serum noch die Kulturüberstände mit monoklonalen Antikörpern reagierten mit nativem B27-Antigen auf Zelloberflächen. Der Bindungstest auf  $\beta$ Gal-Fusionsproteinen erwies sich als problematisch, da an  $\beta$ Galaktosidase und die jeweiligen Fusionsproteine auch alle unspezifischen Seren und monoklonalen Antikörper banden. Da, wie schon erwähnt, die Produktion der B27-Fragmente ohne Fusionsprotein, wahrscheinlich wegen sofortiger Proteolyse, nicht möglich war, wurden für weitere Experimente die Fusionsproteine mit MS2-Polymerase verwendet, die ein 10fach kleineres Molekulargewicht als die mit  $\beta$ Galaktosidase haben.

Die Milzzellen einer mit MS2-FP immunisierten  $F_1$ (C57BL/6xBALB/c)Maus wurden nach der Fusion mit X63Ag8.653 auf 16 Mikrotiterplatten aufgeteilt. In allen 1536 Kulturlöchern zeigte sich nach ca. 1 Woche Wachstum von Hybridomen. Für den ersten Test auf spezifische Antikörper in den Kulturüberständen wurden gleiche Volumina von je 4 Überständen gemischt und im ELISA auf einem Gemisch der 4 Fusionsproteine sowie auf MS2-Polymerase allein getestet. Von den bei diesem Test nur auf FP positiven Mischüberständen wurden, wiederum im ELISA, die Einzelüberstände getestet. Mit den dann noch verbleibenden positiven Kulturen wurde die Bindung an die einzelnen Fusionsproteine untersucht. Von allen Überständen reagierten letztlich 83 mit den Fusionsproteinen. Die Kulturen, deren Antikörper am stärksten reagierten (MS6, MS10, MS17, MS32, MS39 und MS52), wurden kloniert und die Überstände in weiteren Experimenten auf die Spezifität ihrer enthaltenen monoklonalen Antikörper untersucht.

Schema der Selektion der Hybridome:

1. Fusion : 1536 bewachsene Kulturen
2. Test von 384 Überständen (gemischt aus jeweils 4 Überständen)  
 Testsystem: ELISA mit FP-Gemisch sowie MS2-Pol als Kontrolle  
 83 Einzelüberstände nur auf den FP positiv
3. Auswahl der 6 am stärksten reagierenden Überstände aus den Kulturen 1 - 83:  
 MS6, MS10, MS17, MS32, MS39, MS52
4. Klonierung und weitere Untersuchungen der Bindungsspezifität der monoklonalen Antikörper

### 2.2.2. Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper

Die Isotypen der Antikörper klonierter Kulturen wurden durch die Ouchterlony-Immundiffusion mit klassenspezifischen polyklonalen Seren bestimmt. Die Seren für die Isotypbestimmung waren Geschenke von Dr.J.Johnson und von Eugen Kopp.

|      |         |
|------|---------|
| MS6  | Ig M    |
| MS10 | Ig G 2b |
| MS17 | Ig G 2a |
| MS32 | Ig G 3  |
| MS39 | Ig M    |
| MS62 | Ig G 2b |

Da von 83 positiven Antikörpern nur 6 (entspricht 7%) auf ihren Isotyp untersucht wurden, kann diese Verteilung rein zufällig sein und zu keinen Spekulationen über Zusammenhänge zwischen Isotyp, Immunisierungsschema und Antigen bzw. Adjuvantien Anlaß geben.

### 2.2.3. Bindungstest der monoklonalen Antikörper auf den Fusionsproteinen

Zur weiteren Analyse der Bindungsspezifität der monoklonalen Antikörper wurden die Überstände im ELISA auf den einzelnen Fusionsproteinen getestet. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Ergebnisse mit den monoklonalen Antikörpern, die nach diesem Test wegen ihrer teilweise unterschiedlichen Bindungsspezifitäten ausgewählt wurden.

Der bei allen Experimenten als Kontrolle mitgetestete monoklonale Antikörper HC10 (Stam, 1986), der gegen denaturierte schwere Ketten von HLA-B-Antigenen gerichtet ist, reagierte nur mit den Fusionsproteinen D1/2 und D1. Die Erkennung der ersten Domäne ist übereinstimmend mit Bindungsstudien nach Exon-Shuffling-Experimenten (Exons verschiedener HLA-Gene wurden gentechnologisch neu kombiniert), bei denen gezeigt wurde, daß eine Determinante in der ersten Domäne erkannt wird (Güssow, pers. Mitteilung). Der Antikörper MS62 zeigte bevorzugte Bindung an das Fusionsprotein mit der 3. Domäne, und MS39 zeigte bei allen Versuchen starke Kreuzreaktivität mit allen Fusionsproteinen einschließlic der MS2-Pol. MS39 wurde wegen seiner Fähigkeit, in der Immunfluoreszenz an Zelloberflächen zu binden (s. 2.2.5.), ausgewählt. Wie weitere Experimente zeigen (2.2.6. und 2.2.7.), erkennt

|       | D1/2 | D1   | D2  | D3   | MS2  |
|-------|------|------|-----|------|------|
| HC 10 | ++++ | ++++ | -   | -    | -    |
| W6/32 | -    | -    | -   | -    | -    |
| MS 6  | ++++ | ++++ | -   | ++++ | -    |
| MS 10 | +++  | +++  | -   | ++++ | -    |
| MS 17 | +++  | +++  | -   | ++++ | -    |
| MS 32 | ++++ | ++++ | -   | ++++ | -    |
| MS 39 | ++++ | ++++ | +++ | ++++ | ++++ |
| MS 52 | ++   | ++   | -   | ++++ | -    |

Tab. 1: Bindungstest der monoklonalen Antikörper an die Fusionsproteine. Die Bindungsintensität wurde über die Farbstoffkonzentration bei 450nm bestimmt.

|      |                  |   |         |
|------|------------------|---|---------|
| ++++ | E <sub>450</sub> | > | 2.0     |
| +++  | E <sub>450</sub> | > | 1.5     |
| ++   | E <sub>450</sub> | > | 1.0     |
| -    | E <sub>450</sub> |   | 0.0-0.3 |

dieser Antikörper Determinanten auf HLA-Antigenen. Vermutlich existieren auf Bakterienproteinen, die noch in allen Fusionsproteinpräparationen und in der MS2-Fraktion enthalten sind, Determinanten, die mit HLA-Antigenen kreuzreagieren. Es wäre auch möglich, daß Glykosylreste von HLA-Antigenen und Bakterien einander ähneln und von diesem Antikörper erkannt werden.

Die anderen Antikörper, MS6, MS10, MS17 und MS32, zeigten Bindung an die Fusionsproteine D1/2, D1 und D3. Es wäre möglich, daß diese Antikörper eine dreidimensionale Struktur erkennen, die bei der 1. und der 3. Domäne ähnlich ausgeprägt sind. Die HLA-Moleküle sind durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert, eine in der 2. Domäne zwischen den Cysteinen an Pos. 101 und 164, die andere in der 3. Domäne zwischen Pos. 203 und 259. Das Fusionsprotein D2 umfaßt nicht die gesamte 2. Domäne, sondern beginnt statt bei Aminosäure 91 erst bei 114, somit fehlt ihm ein Cysteinrest für die Disulfidbrückenbindung dieser Domäne, sodaß sich Fusionsprotein D2 wahrscheinlich nicht ähnlich der 2. Domäne oder überhaupt nicht globulär falten kann. In der ersten Domäne gibt es keine Disulfidbrücken zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur. Dadurch bedingt können vielleicht die Aminosäuren von Pos. 37 bis 114 auch ohne SS-Brücken eine globuläre Konformation einnehmen, die von den Antikörpern gebunden wird. Für den monoklonalen Antikörper HC10 kann man jedenfalls mit Sicherheit sagen, daß er einen Bereich zwischen Aminosäure 37 und 114 der HLA-schweren Kette erkennt. Dies ist auch nicht verwunderlich, da dieser Antikörper nach Immunisierung mit papaingespaltenen

schweren Ketten eines HLA-Moleküls isoliert wurde. Papain spaltet Proteinketten an Disulfidbrücken, sodaß dadurch die Fragmente der 2. und 3. Domäne ihre dreidimensionale Konformation wahrscheinlich stark verändert haben (wie mein Fusionsprotein D2) und nur die 1. Domäne ihre der nativen Konformation ähnliche Struktur aufrechterhalten hat. Der Antikörper W6/32 erkennt nur HLA-schwere Ketten in Assoziation mit  $\beta 2$ -Mikroglobulin und folglich keines der Fusionsproteine.

#### 2.2.4. Zelluläre Präsentation von Fusionsproteinen und Erkennung durch monoklonale Antikörper

Die EBV-transformierte B-Zelllinie Daudi, die kein  $\beta 2$ -Mikroglobulin produziert und daher keine klassischen Klasse I-Antigene auf ihrer Oberfläche trägt, wurde für die Antigenpräsentation ausgewählt. Nach einer Über-Nacht-Inkubation mit Fusionsproteinen (siehe 4.3.2.10.) wurden die Zellen von Fusionsprotein-Resten über einen Ficoll-Gradienten gereinigt und anschließend dreimal gewaschen. Dann wurden sie wie für eine übliche Immunfluoreszenz weiterbehandelt. Als Positivkontrolle für Oberflächenantigene diente der Anti-Klasse II-Antikörper L243, als Negativkontrolle der Klasse I-spezifische Antikörper W6/32, der weder mit der Zelle selbst noch mit den Fusionsproteinen reagiert. Isotypkontrollen für IgG2a und IgM waren die NP-spezifischen Maus-Monoklonalen S43 und B1-8.

Die Ergebnisse der Analyse im EPICS sind in Abb.12 dargestellt, die numerische Auswertung der Fluoreszenzintensität in Tab.2.

Abb.12: EPICS-Analyse: Bindung der anti-Fusionsprotein-Antikörper an die Fusionsprotein-präsentierende B-LCL Daudi. W: W6/32, L: L243, HC: HC10,  $\mu$ : B1-8 (IgM), y2a: S43 (IgG2a), 6= MS6, 10= MS10 u.s.w. Auf der X-Achse ist die relative Fluoreszenzintensität dargestellt (logarithmische Skala), auf der Y-Achse die Anzahl der positiven Zellen. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalen auf der y-Achse.

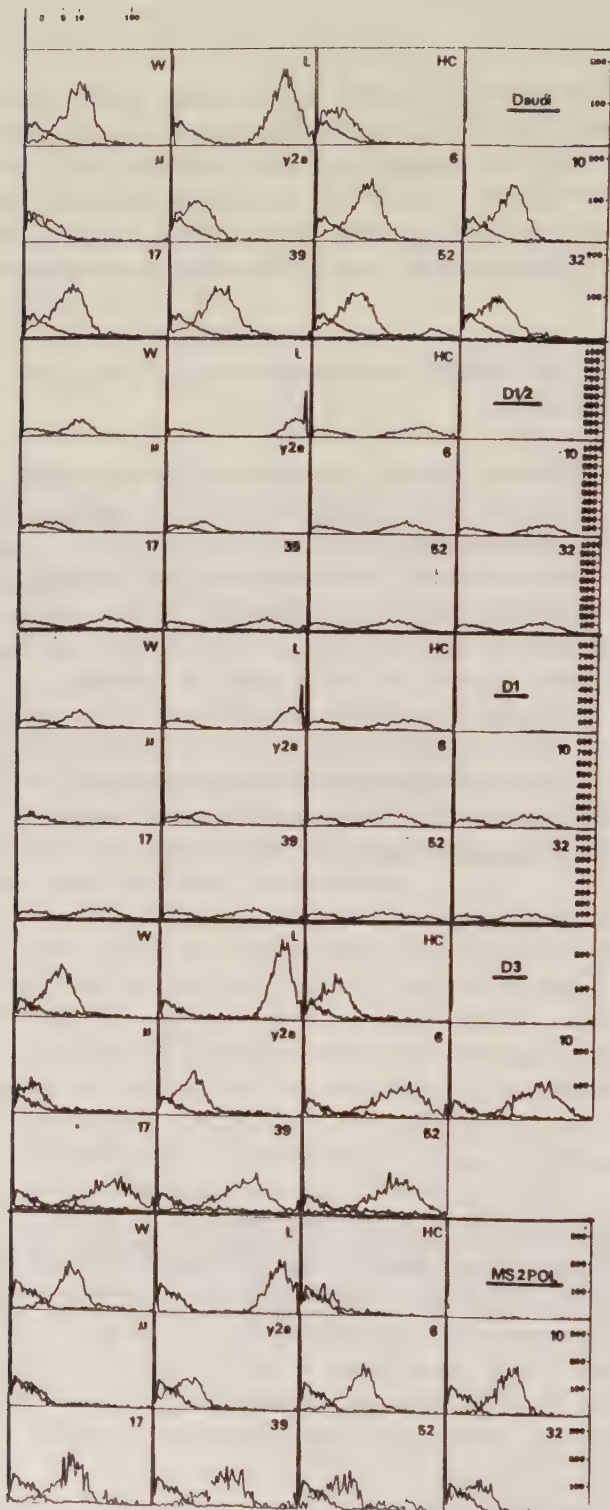


Abb.12

|                | DAUDI | D1/2 | D1  | D3  | MS2Pol |
|----------------|-------|------|-----|-----|--------|
| W6/32          | 11    | 15   | 16  | 5   | 13     |
| L243           | 180   | 350  | 350 | 300 | 300    |
| HC10           | 3     | 100  | 75  | 4   | 3      |
| B1-8 ( $\mu$ ) | 2     | 4    | 2.5 | 3   | 2      |
| S43 (y2a)      | 3     | 5    | 6   | 5   | 5.5    |
| MS6            | 14    | 70   | 45  | 100 | 16     |
| MS10           | 10    | 60   | 45  | 60  | 20     |
| MS17           | 9     | 50   | 45  | 100 | 15     |
| MS32           | 5     | 50   | 45  | ng  | 5      |
| MS39           | 11    | 100  | 75  | 70  | 30     |
| MS52           | 8     | 45   | 60  | 100 | 8      |

Tab.2: Numerische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität der mit monoklonalen Antikörpern gefärbten Fusionsprotein-präsentierenden B-LCL Daudi. ng bedeutet "nicht getestet". Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalen der y-Achse, besonders bei Daudi mit D1/2, die bedingt sind durch automatische Skalenänderung in der Computerauswertung bei Überschreitung eines bestimmten Meßwertes.

Die Messung der Zellpräparation mit D2 entfiel, da der EPICS die Zellen dieser Präparation aufgrund bestimmter Parameter wie stark granuläre Zelloberfläche (bedingt durch eine etwas grobe Fusionsprotein-Präparation) wiederholt als tot einstuft. Überhaupt erwies sich das Experiment, die Präsentation der Fusionsproteine auf Daudi mit monoklonalen Antikörpern darstellen zu wollen, als sehr schwierig, da diese Zellen anscheinend in bestimmten Zyklusphasen Fc-Rezeptoren ausbilden, die unspezifisch Antikörper binden können. Daudi-Zellen, die längere Zeit ununterbrochen in Kultur gehalten wurden und zu höherer Zelldichte herangewachsen waren, wurden wegen unspezifischer Reaktionen, zu verdeutlichen an der starken Bindung von W6/32, für derartige Experimente unbrauchbar.

Für dieses Experiment wurden Daudi-Zellen innerhalb von 3 Tagen nach dem Auftauen verwendet. Hier bindet der anti-HLA-Antikörper W6/32, wie erwartet, an keine der Zellen. Vergleicht man jedoch die Bindung des anti-Klasse II-Antikörpers L234 an Daudi mit und ohne Fusionsprotein, so zeigt sich nach der Inkubation mit den Fusionsproteinen und der MS2-Fraktion ein signifikanter Anstieg der Oberflächen-Klasse II-Expression, teilweise von fast 100%. Da die Dichte von Klasse II-Antigen auf Zelloberflächen auch ein Indiz für Stimulation ist, kann man vermuten,

daß entweder in den FP-Präparationen stimulierende Lektine enthalten sind, oder aber die Bindung der Fusionsproteine selbst diesen Effekt hervorruft.

Die Ergebnisse sind vielleicht nicht allein durch die Bindungsspezifitäten der Antikörper bedingt, sondern auch durch die Fähigkeit der B-Zellen, unterschiedliche Fusionsproteine unterschiedlich gut zu präsentieren. Der Antikörper HC 10 zeigt auch hier, wie schon im ELISA, eine hohe Spezifität für D1/2 und D1. Auch die Isotypkontrollen B1-8 und S43 reagieren weder mit Daudi allein noch mit den präsentierten Fusionsproteinen. Um definitive Aussagen über die Erkennung präsentierter Fusionsproteine durch die monoklonalen Antikörper machen zu können, hätte es einer mehrfachen Wiederholung dieser Experimente bedurft. Es sollte hauptsächlich gezeigt werden, ob B-Zell-Linien fähig sind, die Fusionsproteine zu präsentieren, und somit als Antigen-präsentierende Zellen für T-Zell-Stimulationen eingesetzt werden können. Dieser Nachweis ist nur über die Fusionsprotein-bindenden monoklonalen Antikörper möglich.

Die Daten ermöglichen nur eine Aussage darüber, daß die Fusionsproteine auf der Zelloberfläche präsent sind, nicht aber, ob sie lediglich der Zellmembran angelagert sind oder prozessiert präsentiert werden. Wie schon oben erwähnt, erschienen die Zelloberflächen nach der Inkubation mit den Fusionsproteinen mit Granula beladen zu sein, was im Mikroskop deutlich zu sehen war. Dies könnte auf eine Beladung der Zellen mit Fusionsproteinen nur von außen hindeuten, was jedoch nicht ausschließt, daß auch ein Teil internalisiert und dann prozessiert präsentiert wird.

#### 2.2.5. Oberflächen-Immunfluoreszenz auf HLA-KL.I-tragenden Zellen

Um die Frage nach der Bindung an native, zellständige HLA-Klasse I-Moleküle klären zu können, wurde versucht, B-Zell-Linien und PHA-Blasten (EL, WM, WK) von Spendern verschiedener HLA-Typen mit den anti-PP-monoklonalen Antikörpern zu färben.

Außer den hier aufgeführten Antikörpern MS6 und MS39 reagierte nur in wenigen Fällen der Antikörper MS 52 sehr schwach in der Oberflächenfluoreszenz.

Der Antikörper MS 39 erkannte alle HLA<sup>+</sup> Zellen, unabhängig vom HLA-Typ. (Negativkontrolle auf Daudi s. 2.2.4.). Mit diesem Antikörper wurden bei manchen Linien nur wenige Zellen stark gefärbt, woraus man schließen kann, daß die erkannte Determinante nicht gleich stark auf allen Zellen einer Kultur exprimiert wird. Möglicherweise erkennt MS 39 ein monomorphes Degradationsprodukt von HLA-Antigenen, das nur zu bestimmten Zellzyklusphasen auf der Zelloberfläche erscheint; auch Glykosylierungen der HLA-Antigene könnten zellzyklusabhängig unterschiedlich sein. Es bestehen möglicherweise auch Zusammenhänge mit der Dichte einer Kultur

Abb.13

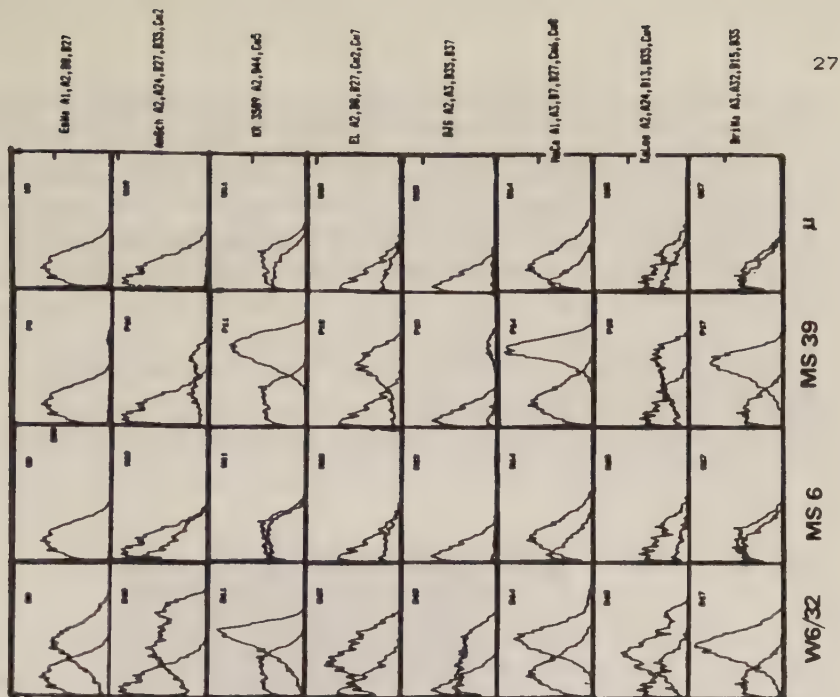
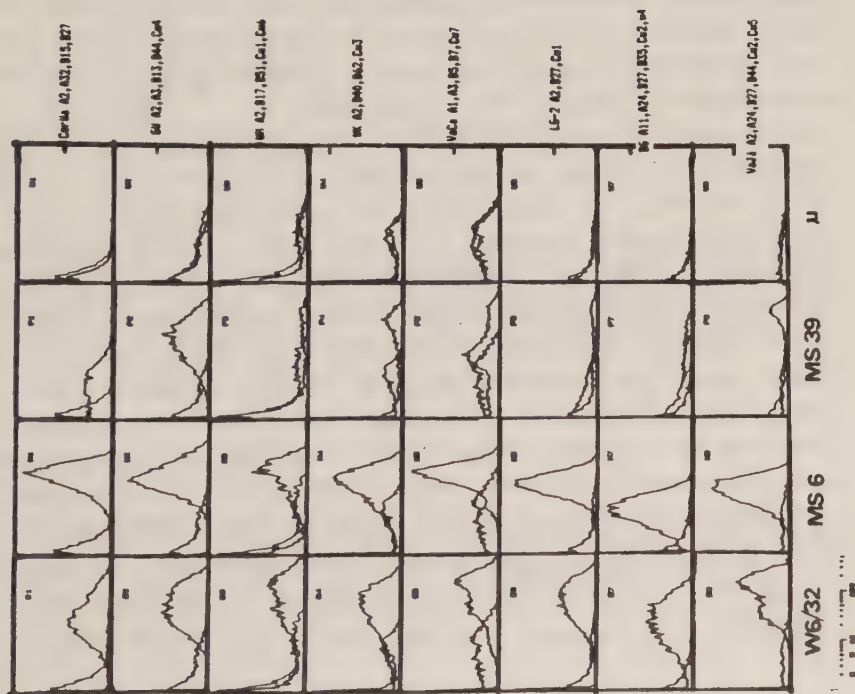


Abb.13: Oberflächenfluoreszenz auf Zelllinien mit den Antikörpern MS 6 und MS 39. Als Positivkontrolle diente der Antikörper W6/32, als Isotyp-Negativkontrolle der NP-spezifische Monoklonale B1-8 (IgM). Die Kontrolle mit FCS und fluoreszierendem Antiserum ist auf jeder Grafik der jeweiligen Zelle zum Vergleich mit aufgezeichnet. Die Markierungen auf den linken Seiten der Grafiken zeigen die relative Zellzahl von 100 an. Die logarithmische Skala unter den ersten 8 Zelllinien gibt die Fluoreszenzintensität an. Neben jeder Zelllinie ist das Spenderkürzel mit der entsprechenden HLA-Typisierung aufgeführt.

und somit der Menge an Oberflächenmolekülen, die freigesetzt, abgebaut und dann wiederum präsentiert werden könnten.

Von den übrigen monoklonalen Antikörpern kann man jedenfalls sagen, daß sie keine Determinanten auf Zelloberflächen binden.

#### 2.2.6. Western Blot

Als Vorversuch (die Ergebnisse sind hier nicht gezeigt) für den Western Blot wurde getestet, ob die ausgewählten Antikörper HLA-Antigene präzipitieren können. Dazu wurden radioaktiv markierte HLA-Antigene mit den Monoklonalen, einem unspezifischen Antikörper und W6/32 isoliert und auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nachdem die Präzipitation mit den anti-FP-Antikörpern eine Bande von ca. 44kD zeigte, die beim unspezifischen Antikörper fehlte und die offensichtlich HLA-Antigen repräsentierte, wurden mit diesen Antikörpern nicht radioaktive Oberflächenantigene isoliert und auf dem Blot durch Bindung des für HLA-B-schwere Ketten spezifischen Antikörpers HC10 charakterisiert.

HLA-Antigene von B27-tragenden Zellen, isoliert mit dem Klasse I-spezifischen Antikörper W6/32, werden auf dem Blot nicht von den FP-spezifischen Antikörpern erkannt. Eine Erklärung dafür könnte in der starken Denaturierung mit SDS liegen. Es ist jedoch möglich, mit diesen Antikörpern Klasse I-Antigene zu isolieren und nach dem Blot mit dem monoklonalen Antikörper HC10 zu entwickeln. Die monoklonalen Antikörper wurden dafür kovalent an Kaninchen  $\alpha$  Maus Ig-SPA-Sepharose gekuppelt, bevor mit ihnen Klasse I- bzw. B27-Antigene aus Zellysaten isoliert wurden. Die kovalente Kupplung ist dabei erforderlich, um störende Immunglobulinbanden im Blot zu vermeiden. Beim Ablösen des Antigens löst sich sonst auch der Antikörper von der Protein A-Sepharose und wird auf dem Blot vom Anti-Maus-Antikörper angefärbt. Da die schweren Ketten des Immunglobulins unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel Banden bei einem Molekulargewicht von 45-60 kD zeigen, könnten so Überlagerungen von Immunglobulin- und HLA-schweren Ketten-Banden entstehen, die eine Interpretation des Blots erschweren oder sogar verhindern.

Die Zellysate stammten von dem Maus-Mastozytom P815, das keine humanen Genprodukte trägt, sowie von der gleichen Mastozytomlinie, die nach Transfektion des B27-Gens das entsprechende menschliche Antigen exprimiert (P815/B27<sup>tr</sup>). So konnte gezeigt werden, daß die monoklonalen Antikörper HLA-B27 präzipitieren können. Die Möglichkeit der Isolierung anderer HLA-Antigene kann nicht ausgeschlossen werden, ist im Western Blot aber nicht spezifisch nachweisbar. Wie der Western Blot zeigt, ließ sich nur von der B27-positiven Zelle mit den Monoklonalen MS6, 10, 17, 32, 39 und 52 sowie W6/32 das Klasse I-Antigen isolieren, das dann auf dem Blot mit HC10 entwickelt wurde, bei der nicht transfizierten P815-Zelle wurde kein Produkt des entsprechenden Molekulargewichts von 43-44 kD gefärbt. Immerhin wäre eine Kreuzreaktivität mit Maus-H2 oder einem anderen mausspezifischen Antigen möglich gewesen wäre

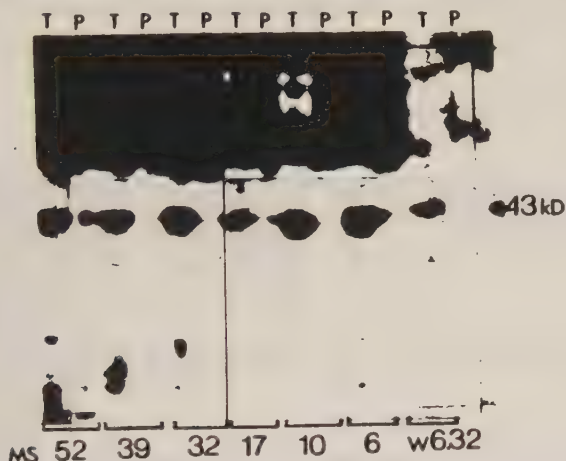


Abb.14: Western Blot

Isolation von B27-Antigen von den Zelllinien P815 (P) und P815/B27<sup>tr</sup> (T) (P815 transfiziert mit dem Gen für B27) mit den monoklonalen Antikörpern MS6, MS10, MS17, MS32, MS39, MS52 und W6/32. Entwickelt wurde mit dem monoklonalen Ak HC10. Die Lysate wurden von  $6 \times 10^7$  B27<sup>tr</sup>-Zellen und  $4 \times 10^7$  P815-Zellen hergestellt.

#### 2.2.7. Isoelektrische Fokussierung

Um zu zeigen, welche Klasse I-Antigene von den Antikörpern erkannt werden, wurden biosynthetisch radioaktiv markierte HLA-Antigene mit den monoklonalen Antikörpern MS6, MS10, MS17, MS32, MS39, MS52, TM1 - TM6, HC10 und W6/32 isoliert und durch isoelektrische Fokussierung aufgetrennt. Diese Antikörper isolierten aus

dem Lysat der für Klasse I homozygoten B-LCL LG2 (A2, B27, Cw1) vorwiegend HLA-B27, jedoch auch HLA-A2 und HLA-Cw1. Entgegen der Behauptung in der Veröffentlichung von Güssow (1987) zeigt auch die Präzipitation mit dem Antikörper W6/32 in der Isoelektrischen Fokussierung ein Bandenmuster, das mit dem von HC10 erhaltenen und für Cw1 beschriebenen übereinstimmt. Von den bei Güssow (1987) diskutierten verschiedenen HLA-Cw1-Produkten werden nicht alle gleichermaßen gut von den monoklonalen Antikörpern erkannt. Die Antikörper MS6, 10, 17, 32, 39 und 52 binden gleiche Produkte mit gleicher Intensität, was die identischen Bandenmuster zeigen. Das Gleiche gilt für die Antikörper der TM-Gruppe (Thurau, 1987) mit Ausnahme von TM2 und TM3. Die Antikörper HC10 und TM3 erkennen eines der in der Region von Cw1 liegenden Produkte mit höherer Affinität als die anderen getesteten Antikörper. Außerdem ist zu sagen, daß von den Antikörpern TM1-6 sowie von W6/32 ein Produkt in der Cw1-Region, das näher der Kathode läuft, wesentlich besser erkannt wird als von den MS-Antikörpern bzw. von HC10.

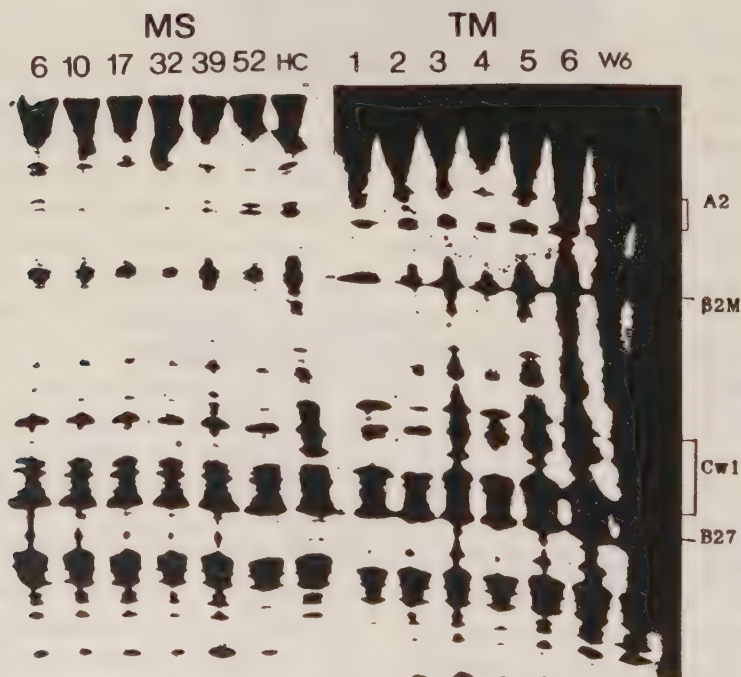


Abb.15: Isoelektrische Fokussierung

Präzipitation der HLA-Klasse I-Antigene von der B-LCL LG2 mit den monoklonalen Antikörpern MS6, MS10, MS17, MS32, MS39, MS52, TM1 - TM6 sowie W6/32 und HC10.

### 2.3. Zelluläre Erkennung von Fusionsproteinen

In den folgenden Experimenten sollte gezeigt werden, ob mit Fusionsproteinen, die bestimmte Abschnitte des HLA B27-Antigens repräsentieren, eine spezifische T-Zell-Antwort induziert werden kann oder ob eine B27-spezifische T-Zell-Reaktion durch Fusionsproteine beeinflusst werden kann. Aus den Untersuchungen sollte hervorgehen, ob denaturierte Abschnitte eines MHC-Moleküls gleiche T-Zell-Reaktionen auslösen können oder von T-Zellen gleichermaßen erkannt werden wie native, auf Zelloberflächen exprimierte Moleküle.

Einerseits wurde versucht, durch Stimulation mit Fusionsproteinen die Proliferation von T-Zellen, hauptsächlich von T-Helfer-Zellen zu aktivieren (Primärantwort, Exp.1, Exp.2a) und durch Restimulation mit nativem, zellständigem Antigen eine verstärkte Immunantwort (Sekundärantwort) der mit Fusionsprotein vorstimulierten Zellen zu generieren (Exp. 2b).

Andererseits sollten durch die Fusionsproteine auch zytotoxische T-Zellen B27-spezifisch stimuliert (s. 2.3.2.) bzw. eine B27-spezifische zytotoxische Allo-Reaktion inhibiert werden.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit monoklonalen Antikörpern wurden für die zellulären Versuche sowohl Fusionsproteine mit  $\beta$ Galaktosidase als auch mit MS2-Polymerase verwendet.

#### 2.3.1. Stimulation von T-Helferzellen

Es sollte gezeigt werden, ob Fusionsproteine, die von autologen Makrophagen oder autologen, EBV-transformierten B-Zellen prozessiert und präsentiert werden, T-Helfer-Zellen stimulieren können. Als Maß für die Stimulation diente der von T-Helferzellen gebildete T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2, dessen Menge über die Proliferation einer IL-2-abhängigen Kultur bestimmt wurde. Die Proliferation dieser IL-2-abhängigen Zellen wurde durch den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen. Die angegebenen Werte sind gezählte Zerfälle des Thymidins/Minute (cpm).

Es wurde einerseits die Primärantwort auf präsentierte Fusionsproteine gemessen, andererseits die Sekundärantwort nach Restimulation mit kompletten Zellen B27 positiver und B27 negativer Spender. Die Idee dabei war, daß HLA-Oberflächenantigene in einer prozessierten Form präsentiert werden, die dem HLA-Anteil der Fusionsproteine ähnlich ist. Wäre dieses der Fall, könnte man nach Restimulation von Kulturen, die mit bestimmten Fusionsproteinen vorstimuliert waren, eine erhöhte Antwort erwarten, da sich die schon einmal stimulierten T-Zellen an das Antigen "erinnern" und eine schnellere und höhere Antwort geben.

### 2.3.1.1. Experiment 1:

|      | 24 Std                     | 48 Std                    | 72 Std                  | 96 Std                |
|------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
| D1/2 | 6470 ± 3796<br>4629 ± 3319 | 2806 ± 920<br>144 ± 45    | 270 ± 116<br>253 ± 25   | 488 ± 83<br>595 ± 23  |
| D1   | 1525 ± 767<br>1172 ± 731   | 2681 ± 320<br>751 ± 208   | 278 ± 125<br>1257 ± 289 | 308 ± 33<br>523 ± 72  |
| D2   | 799 ± 462<br>480 ± 247     | 1897 ± 212<br>486 ± 338   | 294 ± 93<br>317 ± 93    | 361 ± 39<br>729 ± 232 |
| D3   | 1046 ± 406<br>1043 ± 554   | 1744 ± 554<br>1874 ± 1070 | 330 ± 87<br>365 ± 20    | 193 ± 64<br>301 ± 96  |
| βGal | 945 ± 664<br>1346 ± 259    | 1852 ± 724<br>1230 ± 1001 | 953 ± 61<br>1894 ± 192  | 172 ± 78<br>147 ± 80  |
| DJS- | 239 ± 146                  | 5132 ± 2446               | 477 ± 109               | 644 ± 112             |
| LCL  | 224 ± 51                   | 4359 ± 3213               | 907 ± 290               | 597 ± 355             |

|             |             |                |           |
|-------------|-------------|----------------|-----------|
| Kontrollen: | RPMI-Medium | IL-2-Überst.   | 1% PHA    |
|             | 167 ± 61    | 80695 ± 6252   | 372 ± 94  |
|             | 90 ± 26     | 103870 ± 31715 | 455 ± 142 |

Tab.3: Spender DJS: HLA-A2, A3, B35, B37, Cw4, DR1, DR2, DQw1

Antigenpräsentation: autologe B-LCL

2.5x10<sup>6</sup> PBL wurden mit der gleichen Anzahl Fusionsprotein-präsentierender B-LCL in 7ml RPMI/15% Humanserum inkubiert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde Kulturüberstand entnommen und auf den Gehalt an IL-2 untersucht. Die beiden untereinanderstehenden Werte geben den Thymidineinbau während der Proliferation von von zwei verschiedenen IL-2-abhängigen Linien wieder. Es werden Mittelwerte von Triplikaten ± Standardabweichung gezeigt.

Nach 24 Std. zeigte sich optimale Stimulation durch D1/2. Die Standardabweichung ist zwar sehr hoch, dennoch ist der 24Std.-Wert beider IL-2-abhängiger Linien für D1/2 höher als alle anderen zu diesem Zeitpunkt gemessenen. Das starke Absinken nach 48 Stunden ist vielleicht mit dem Anstieg des eigenen IL-2-Bedarfs der primären Kultur zu erklären. Der IL-2-Anstieg der Kultur mit autologen LCL ohne FP nach 48 Stunden und anschließendem starken Absinken zeigt, daß nach diesem Zeitpunkt wahrscheinlich eine autologe, vielleicht EBV-bedingte T-Zellantwort beginnt, in deren Verlauf der IL-2-Verbrauch zunimmt.

## 2.3.1.2. Experiment 2:

## Experiment 2a: Primärantwort auf Fusionsproteine

Wie in Experiment 1 wurden Spenderzellen mit präsentierten Fusionsproteinen stimuliert. Diesmal wurden autologe Makrophagen präpariert (s.4.3.2.9.) und als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt. Die Kontrolle mit Makrophagen ohne Fusionsprotein wurde vernachlässigt, da man ohnehin keine Antwort auf unbehandelte eigene Blutzellen erwartet. Bei EBV-transformierten B-Zellen könnten dagegen Störungen durch eine virusrestringierte Reaktion eintreten.

Wie schon in Experiment 1 zeigte sich auch in Experiment 2 nach primärer Stimulation mit D1/2 nach 24 Stunden optimaler IL-2-Gehalt im Überstand, der danach wahrscheinlich durch Eigenverbrauch der Kultur wieder absinkt. Die Sekundärantwort sollte zeigen, ob nach Restimulation mit einer Zelllinie, die das B27-Antigen auf ihrer Oberfläche trägt, im Vergleich zu einer B27-negativen Linie die T-Zell-Antwort verstärkt ausfällt. Tatsächlich zeigte sich bereits nach 5 Stunden eine signifikant erhöhte IL-2-Antwort der D1/2-vorstimulierten T-Zellen auf die B27-tragenden PBL EL. Auch bei den B27-negativen PBL ST erfolgte, verglichen mit an

|                   | 18 Std       | 24 Std       | 48 Std       |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| D1/2              | 51315 ± 3317 | 56030 ± 4051 | 11725 ± 4186 |
| D1                | 396 ± 99     | 1056 ± 823   | 773 ± 265    |
| D2                | 3799 ± 611   | 4012 ± 624   | 7691 ± 1093  |
| D3                | 766 ± 279    | 695 ± 89     | 431 ± 15     |
| MS2-Pol           | 708 ± 157    | 584 ± 72     | 569 ± 189    |
| Kontrollen:       |              |              |              |
| 50% IL-2-Medium : | 71356 ± 4491 |              |              |
| 25% IL-2-Medium : | 30271 ± 1647 |              |              |
| 1% PHA :          | 461 ± 137    |              |              |
| RPMI-Medium :     | 483 ± 169    |              |              |

Tab.4: Spender: GW: HLA-A2, A3, B13, B44, Cw6, DR1, DR4, DQw1, DQw3

Antigenpräsentation: autologe Makrophagen

1x10<sup>6</sup> PBL wurden mit 5x10<sup>5</sup> FP-präsentierenden autologen Makrophagen in 2ml RPMI/10% Humanserum inkubiert. Nach 18, 24 und 48 Stunden wurde Kulturüberstand entnommen und auf den Gehalt an IL-2 untersucht.

# Experiment 2b: Restimulation mit B27<sup>+</sup> und B27<sup>-</sup> Spenderzellen

Restimulation mit PBL EL: A2, B8, B27, Cw2, Cw7, DR3, DRw13, DQw1, DQw2

|         | 5 Std           | 14 Std        | 18 Std        | 24 Std        | 36 Std         |
|---------|-----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| D1/2    | 10826<br>± 1370 | 983<br>± 352  | 944<br>± 352  | 1338<br>± 554 | 1530<br>± 563  |
| D1      | 422<br>± 71     | 1013<br>± 150 | 1070<br>± 431 | 1073<br>± 399 | 1479<br>± 363  |
| D2      | 580<br>± 215    | 824<br>± 467  | 718<br>± 139  | 631<br>± 241  | 2686<br>± 1472 |
| D3      | 708<br>± 212    | 1319<br>± 350 | 574<br>± 63   | 857<br>± 117  | 573<br>± 102   |
| MS2-Pol | 333<br>± 103    | 1865<br>± 822 | 1649<br>± 856 | 1263<br>± 98  | 1508<br>± 77   |

Restimulation mit PBL ST: A1, A26, B8, B14, Cw7, Cw8, DR3, DR7, DQw2, DQw3

|             | 5 Std                                                                                                             | 14 Std       | 18 Std        | 24 Std       | 36 Std       |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| D1/2        | 6488<br>± 1093                                                                                                    | 496<br>± 72  | 1095<br>± 870 | 887<br>± 526 | 812<br>± 596 |
| D1          | 580<br>± 307                                                                                                      | 473<br>± 51  | 403<br>± 82   | 549<br>± 85  | 444<br>± 44  |
| D2          | 420<br>± 117                                                                                                      | 643<br>± 334 | 481<br>± 187  | 492<br>± 178 | 523<br>± 113 |
| D3          | 480<br>± 55                                                                                                       | 628<br>± 208 | 546<br>± 170  | 479<br>± 152 | 417<br>± 112 |
| MS2-Pol     | 480<br>± 169                                                                                                      | 628<br>± 208 | 484<br>± 226  | 610<br>± 269 | 690<br>± 215 |
| Kontrollen: | 50% IL-2-Medium : 71356 ± 4491<br>25% IL-2-Medium : 30271 ± 1647<br>1% PHA : 461 ± 137<br>RPMI-Medium : 483 ± 169 |              |               |              |              |

Tab.5: Die mit FP-präsentierenden Makrophagen stimulierten PBL (s. Tab.4) wurden 10 Tage nach der ersten Stimulation mit gleicher Anzahl bestrahlter PBL EL oder PBL ST restimuliert (Zellkonzentration 10<sup>6</sup>/ml). Nach 5, 14, 18, 24 und 36 Std wurden Überstände entnommen und auf ihren IL-2-Gehalt untersucht. Die Testungen erfolgten wiederum durch Zugabe der Überstände zu einer IL-2-abhängigen Kultur; die IL-2-induzierte Proliferation wurde über <sup>3</sup>H-Thy-midin-Einbau gemessen.

deren Kulturen, bei den mit D1/2 immunisierten T-Zellen eine verstärkte Antwort. Daraus läßt sich schließen, daß Determinanten, die nur von D1/2 und nicht von D1 und/oder D2 allein gebildet werden, von T-Helfer-Zellen ähnlich wie HLA-Antigen von Zelloberflächen erkannt werden können, jedoch nicht unbedingt spezifisch für B27. Vermutlich wird die erkannte Determinante von Aminosäuren vor und nach AS-Position 114 gebildet.

### 2.3.2. Stimulation von zytotoxischen T-Zellen mit Fusionsproteinen

#### 2.3.2.1. Experiment 1

Das erste Experiment sollte zeigen, ob Fusionsprotein-präsentierende autologe Makrophagen oder B-LCL durch Stimulation zytotoxischer T-Zellen eine B27-spezifische Zellyse induzieren können. B-LCL und Makrophagen eines B27-negativen Spenders wurden dafür mit dem  $\beta$ Galaktosidase-Fusionsprotein D1/2 inkubiert, ein Teil der Makrophagen wurde nach der Inkubationszeit mit Glutaraldehyd fixiert (die Zellen für 3 Min. bei R.T. mit 0.1% Glutaraldehyd versetzen, danach mit RPMI/10% FCS waschen). Stimulatorzellen mit und ohne Fusionsprotein wurden identisch behandelt, die Makrophagen wurden mit 2000rad, die B-LCL mit 5000rad bestrahlt, bevor sie zu den autologen PBL gegeben wurden. Nach 6tägiger Stimulation wurde die Zytotoxizität für die B27<sup>+</sup> B-LCL LG2, die autologe B-LCL DJS und B27 negative PHA-Blasten getestet.

Das Ergebnis dieses Experiments zeigt, daß nach Stimulation mit autologen, Fusionsprotein-präsentierenden Zellen die Lyse der B27-positiven B-LCL LG2 signifikant erhöht wird, was nach Stimulation mit autologen Zellen ohne FP nicht der Fall ist. Makrophagen und B-Zelllinien sind beide gleichermaßen gut zur Antigenpräsentation geeignet, die Fixierung der Makrophagen mit Glutaraldehyd scheint für die Antigenpräsentation eher einen nachteiligen Effekt zu haben, möglicherweise werden durch Glutaraldehyd wichtige Determinanten zerstört. Die Lyse der B27-negativen PHA-Blasten sowie der autologen B-Zelllinie ist, unabhängig von der Stimulation, signifikant niedriger als die der B27-positiven Linie. Ob dieser Effekt tatsächlich durch das Fusionsprotein D1/2 bzw. dessen B27-Anteil bedingt ist und ob die Zytotoxizität ausschließlich B27-spezifisch ist, müssen weitere Experimente zeigen.

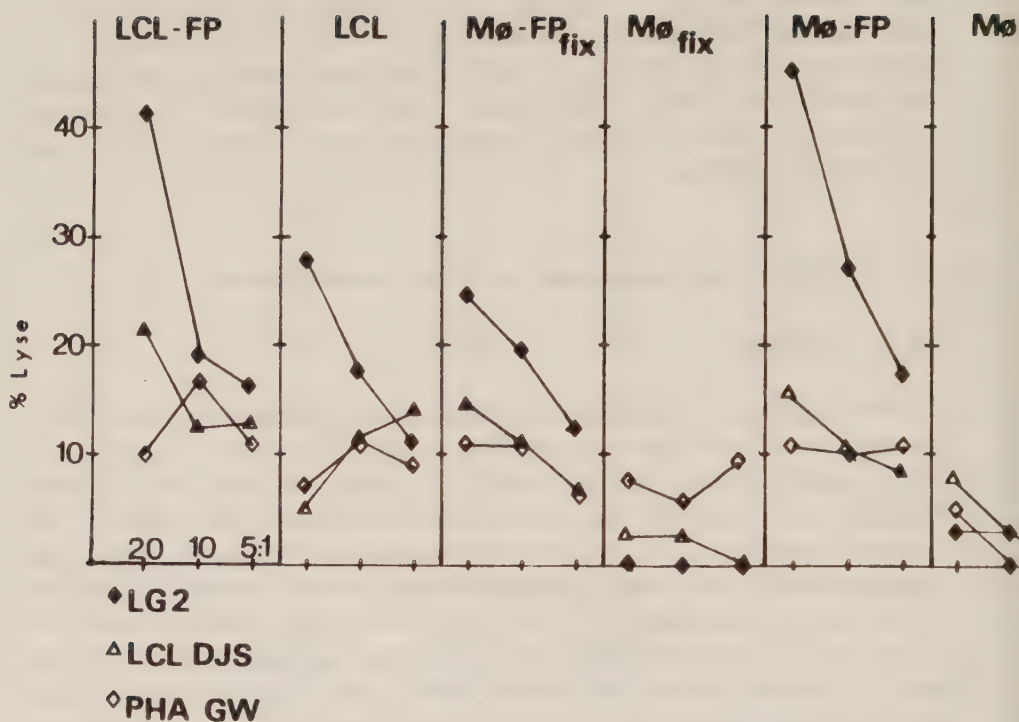


Abb. 16: Effektorzellen : DJS HLA-A2, A3, B35, B37, Cw4  
 Stimulatorzellen : LCL DJS mit und ohne D1/2-βGal  
 Makrophagen mit und ohne D1/2-βGal, fix.  
 " " " nicht fix.

Zielzellen : LCL LG2 HLA-A2, B27, Cw1  
 LCL DJS HLA-A2, A3, B35, B37, Cw4  
 PHA GW HLA-A2, A3, B13, B44, Cw6

Die spezifische Lyse in % ist auf der y-Achse angegeben, die x-Achse zeigt die Verhältnisse von Effektoren : Zielzellen (20:1, 10:1, 5:1)

### 2.3.2.2. Experiment 2

Bei diesem Experiment wurde die Lyse zweier B-LCL nach Stimulation mit βGal-FP D1/2 bzw. βGal ohne B27-Anteil sowie mit einer B27-positiven B-Zelllinie gezeigt. Die Antigene wurden von autologen Makrophagen präsentiert, die mit 2000rad bestrahlt waren; die B-LCL war mit 5000rad bestrahlt.

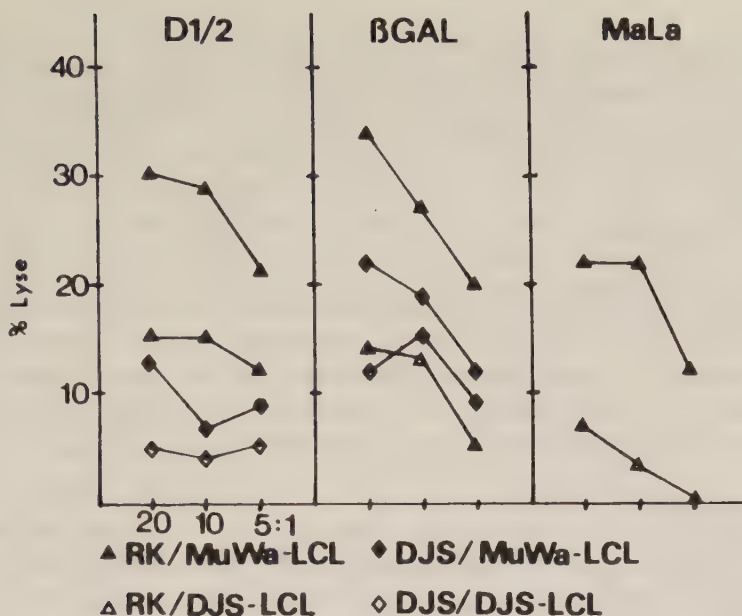


Abb.17: Effektorzellen : RK HLA-A2, B18, B60, Cw3, Cw8  
 DJS HLA-A2, A3, B35, B37, Cw4  
 Stimulatorzellen : autologe Makrophagen mit βGal-FP D1/2  
 " " " " βGal  
 Zielzellen : B-LCL MaLa HLA-A2, A3, B27, B7, Cw2  
 : B-LCL MuWa HLA-A2, A3, B27, B35  
 : B-LCL DJS HLA-A2, A3, B37, B35, Cw4

Die Stimulatorlinie MaLa selbst konnte wegen mangelhafter  $^{51}\text{Cr}$ -Inkorporation nicht als Zielzelle eingesetzt werden. Eine A3- oder B35-spezifische Lyse der LCL MuWa konnte durch die Kontrolle mit der Linie DJS, die sich von MuWa nur durch B27 bzw. B37 unterscheidet, ausgeschlossen werden. Nach Stimulation der Effektorzellen RK mit der B27<sup>+</sup> Linie MaLa zeigt sich eine starke B27-spezifische Lyse der LCL MuWa. Dieselbe Zelllinie wird nach Stimulation mit D1/2 und βGal noch stärker lysiert. Auch die Lyse der B27-negativen Linie DJS wird nach Stimulation mit D1/2 und βGal, im Vergleich zur Stimulatorzelle MaLa, erhöht. Die B27-spezifische Lyse durch die Effektorzelle DJS ist nach Stimulation durch βGal sogar noch höher als nach Stimulation mit dem Fusionsprotein D1/2. Nachdem bei der Stimulation kaum Unterschied zwischen D1/2 und βGal besteht, ist anzunehmen, daß entweder die βGalaktosidase selbst oder in der Präparation vorhandene Bakterienproteine einen stimulierenden Effekt auf die zytotoxischen T-Zellen haben, nicht aber der B27-Anteil des Fusionsproteins. Es wäre auch eine Überlagerung einer

B27-spezifischen Lyse und einer unspezifischen Lyse von B-Zelllinien möglich, die aber in der Mischkultur nicht zu unterscheiden sind, sondern nur mit T-Zell-Klonen nachgewiesen werden können.

### 2.3.2.3. Experiment 3

Mit einem anderen Spender und Stimulation mit allen Fusionsproteinen wurde ein ähnliches Experiment wie bei 2.3.2.2. durchgeführt. PBL des Spenders GW wurden mit autologen, FP-präsentierenden Makrophagen und B27-positiven PBL stimuliert. Die lytische Aktivität wurde dann an einer B27 positiven B-LCL und einer B-Zelllinie, die gleiche HLA-Antigene trägt wie die Effektorzelle, gemessen.

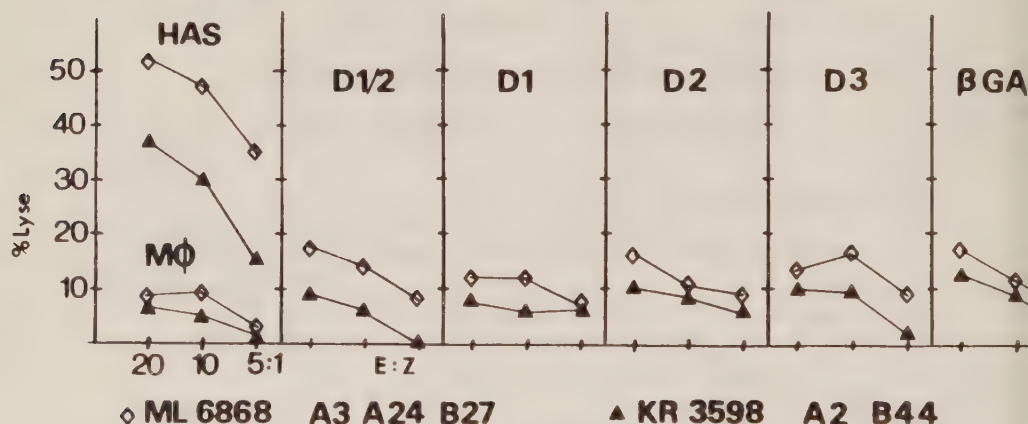


Abb.18: Effektorzellen : GW HLA-A2, A3, B13, B44, Cw6  
 Stimulatoren : autologe Makrophagen mit FP : D1/2, D1, D2, D3, βGal  
 autologe Makrophagen ohne FP  
 PBL Has HLA-A2, A3, B27, B37, Cw1  
 Zielzellen : LCL ML 6868 HLA-A3, A24, B27, Cw2  
 LCL KR 3598 HLA-A2, B44, Cw5

Wie schon in Experiment 2 zeigt sich auch hier eine gleichermaßen hohe Zytotoxizität nach Stimulation mit βGalaktosidase allein und mit den Fusionsproteinen. Auch zwischen den einzelnen Fusionsproteinen zeigen sich keine großen Unterschiede, woraus man wiederum folgern kann, daß der B27-Anteil der Fusionsproteine keinen Einfluß auf die Spezifität der Zellyse hat. Die Lyse nach FP-Inkubation ist vergleichsweise gering, die Stimulation mit der B27-positiven Zelle Has führt zu einer 3-4fach höheren Zytotoxizität, dennoch ist, verglichen mit der un-

stimulierten, d.h. nur mit autologen Makrophagen inkubierten Kultur, eine gewisse Erhöhung der Zytotoxizität zu vermerken. Bemerkenswert ist, daß die Stimulation mit der B27-positiven Zelle Has auch zu einem Anstieg der Lyse der B27-negativen Kontrollzelle KR führt, die bis auf Cw5 nur Klasse I-Antigene hat, die auch die Effektorzelle besitzt. Die Lyse dieser Zelle ist als Autoaggression zu sehen, nach Tilkin (1987) hat man (zumindest für Klasse II) autoreaktive T-Zellen nach Stimulation mit Fremdanitigen gefunden, die als für den Selbst-MHC hochaffine Klone interpretiert werden und für ihre Reaktivität kein zusätzliches Antigen mehr benötigen.

#### 2.3.2.4. Experiment 4

Dieses Experiment wurde wieder mit PBL des Spenders GW durchgeführt, diesmal aber mit MS2-Polymerase-Fusionsproteinen. Zur Kontrolle wurde mit den B27-positiven PBL EL stimuliert, als Zielzellen dienten die Maus-Mastozytomlinie P815 und die das B27-Antigen auf ihrer Oberfläche exprimierende Linie P815/B27<sup>R3</sup>, die einen Aminosäureaustausch an Pos. 131 trägt. Der Austausch ist serologisch unerheblich und zeigte auch bei anderen zellulären Experimenten keinen Unterschied zur nicht mutierten Linie. Die mutierte Linie zeichnet sich aber durch hohe Oberflächenantigen-Expression aus und wurde daher für dieses Experiment verwendet.

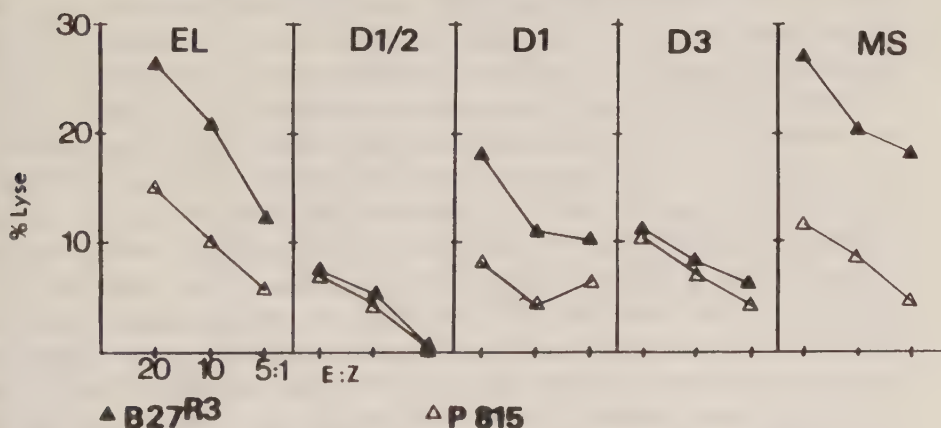


Abb.19: Effektorzellen : GW HLA-A2, A3, B13, B44, Cw6  
 Stimulatoren : autologe Makrophagen mit MS2-Pol-FP D1/2, D1, D2, D3, MS2  
 PBL EL HLA-A2, B8, B27, Cw2, Cw7  
 Zielzellen : P815/B27<sup>R3</sup> HLA-B27  
 P815

Die Stimulation mit MS2-Pol ist in diesem Fall genauso effektiv wie die Stimulation mit der B27-positiven Zelle EL. Da die Lyse der Kontrollzelle P815 ohne B27 wesentlich geringer ist und sich beide Zellen nur durch das menschliche B27-Antigen unterscheiden, ist die Lyse zumindest spezifisch für menschliche HLA-Antigene. Bei Stimulation mit D1/2 und D3 zeigt sich kein Unterschied in der Erkennung zwischen B27<sup>+</sup> und B27<sup>-</sup>, lediglich bei D1 ist eine Verstärkung der B27-spezifischen Lyse zu sehen. Die schwache Antwort bei D1/2 und D3 ist wahrscheinlich experimentell bedingt.

### 2.3.3. Stimulation von zytotoxischen Zellen mit Bakterienlysaten

#### Experiment 5

Die Lymphozyten aus heparinisiertem Blut dreier Spender (EL, B27<sup>+</sup>; RK, B27<sup>-</sup>; GW, B27<sup>-</sup>) wurden über Nacht mit Bakterienlysaten inkubiert. Die Lysate wurden von Über-Nacht-Kulturen in linearer Wachstumsphase gewonnen. In dieser Zeit sollten die antigenpräsentierenden Zellen Antigene aus den Bakterienlysaten aufnehmen, prozessieren und präsentieren. Nicht aufgenommene, überschüssige Lysatanteile wurden durch Waschen der Zellen entfernt. Die Kultur wurde für 6 Tage mit den präsentierten Bakterienlysaten stimuliert, bevor die Zytotoxizität gemessen wurde. Die Bakterienlysate stammten von einem Gemisch des MS2-Fusionsprotein-produzierenden E.coli-Stammes 537, die durch einen Hitzeschock zur FP-Produktion angeregt wurden, ferner von dem *Yersinia enterocolitica*-Stamm des häufigsten Serotyps O:3 (Heesemann 1984). Von diesem *Yersinia*-Stamm wurden zwei Lysate hergestellt, eines von *Yersinien* mit einem Plasmid, das den Bakterien u.a. virulente Eigenschaften verleiht und das andere von demselben Stamm ohne Plasmid. Die Idee war, daß auf dem Plasmid auch Oberflächenantigene codiert werden könnten, die auf irgendeine Weise die zelluläre Immunantwort beeinflussen (Upfold, 1985). HLA-B27-positive Individuen haben nach der Erkrankung mit manchen Enterobakterien, zu denen auch *Yersinia* gehört, ein erhöhtes Risiko, an Ankyloisierender Spondylitis oder Morbus Bechterew zu erkranken (Geczy, 1980, 1983; Prendergast, 1984, Upfold, 1985). Bei diesen Krankheiten treten Entzündungen der Gelenke auf, die zur Degeneration derselben führen können. Die Zusammenhänge und Mechanismen dieser Krankheitskorrelation sind bislang ungeklärt, man vermutet Kreuzreaktivitäten von HLA-B27 oder einem Antigen, das im Kopplungsungleichgewicht mit B27 vererbt wird, mit Oberflächenantigenen dieser Bakterien, die entweder zum Ausbleiben einer Immunantwort oder zur Autoimmunerkrankung führen könnten.

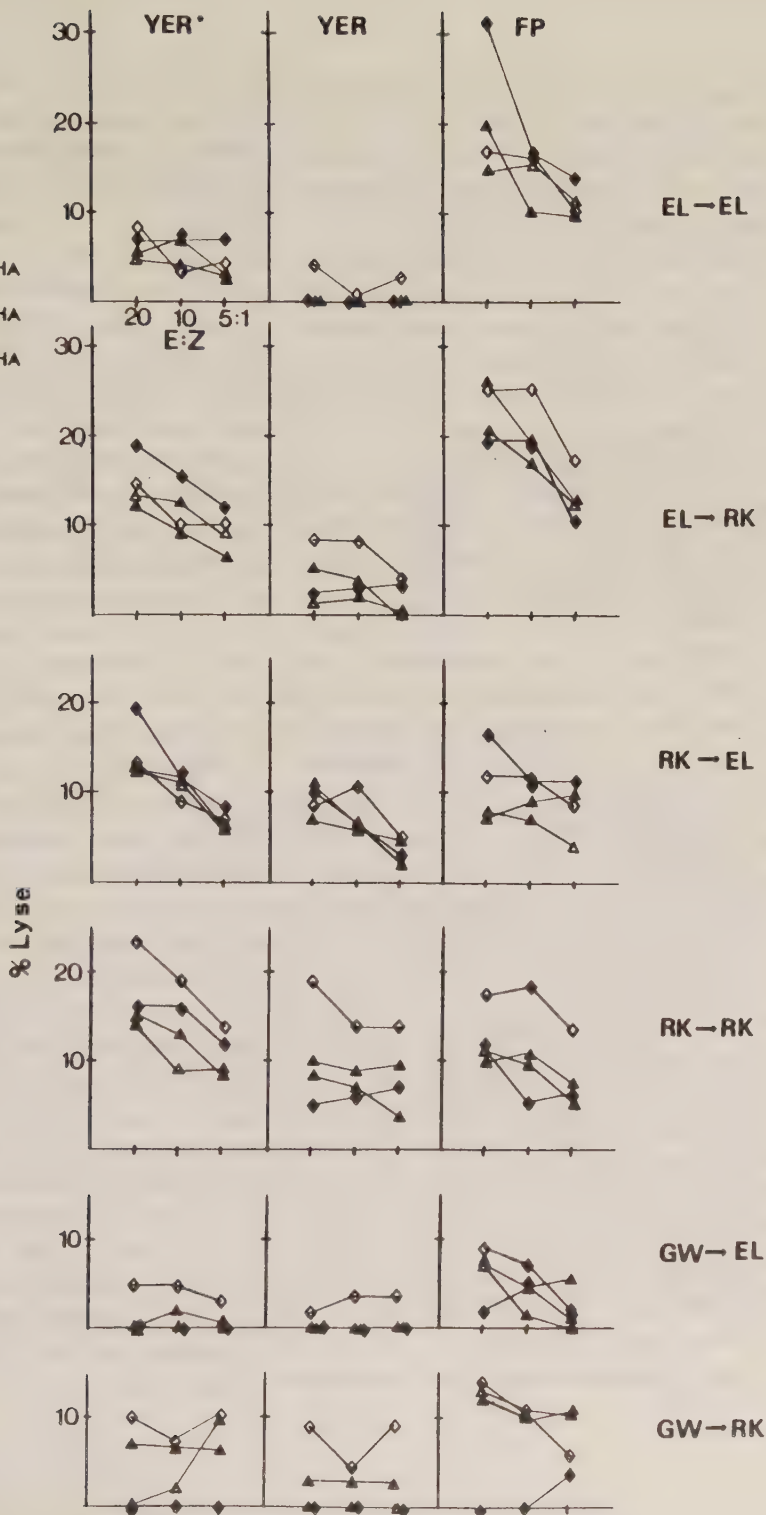


Abb.20

Abb.20: Effektorzellen : PBL EL HLA-A2, B8, B27, Cw2, Cw7 mit:  
 Yersinia + Plasmid (Yer<sup>+</sup>)  
 Yersinia - Plasmid (Yer)  
 E.coli mit Fusionsproteinen (FP)  
 PBL RK HLA-A2, B18, B60, Cw3, Cw8 mit:  
 Yer<sup>+</sup>  
 Yer<sup>-</sup>  
 FP  
 PBL GW HLA-A2, A3, B13, B44, Cw6 mit:  
 Yer<sup>+</sup>  
 Yer<sup>-</sup>  
 FP  
 Zielzellen : PHA-Blasten der Effektorzellen ohne und  
 mit Bakterienlysaten Y<sup>+</sup>, Y<sup>-</sup> und FP

In dem folgenden Experiment wurde nun untersucht, ob verschiedene Bakterienlysate die Generation der Zytotoxizität von Spenderzellen auf verschiedene B27<sup>+</sup> und B27<sup>-</sup>-Zielzellen unterschiedlich beeinflussen. Dazu wurden, wie schon erwähnt, PBL von drei verschiedenen Spendern mit den drei Bakterienlysaten stimuliert und dann die Lyse verschiedener Zielzellen mit und ohne präsentierten Bakterienlysaten getestet.

Die Stimulation der Spenderzellen EL (B27<sup>+</sup>) mit FP führt nicht nur zu einer erhöhten Lyse Bakterienprotein-beladener autologer Zielzellen, sondern auch zu einer verstärkten Zytotoxizität für die eigenen PHA-Blasten. Die Stimulation mit Yer<sup>+</sup> bewirkt, im Vergleich zu der Stimulation mit Yersinienlysaten ohne Plasmid, eine leicht erhöhte Zytotoxizität für die eigenen, Lysat-präsentierenden Zellen. Es ist nicht auszuschließen, daß die PHA-Präparation Agglutinine enthält, die Bakterienagglutininen, bes. denen von E.coli 537, ähnlich sind und daher zu einer vermeintlichen Aggression gegen autologe Blasten führen, die aber durch die Agglutinine auf ihrer Oberfläche zu Antigen-präsentierenden Zellen geworden sind.

Die T-Zell-Antwort verschieden vorstimulierter EL-Zellen auf RK-Zielzell-Präparationen zeigt wiederum eine generelle Erhöhung der Zytotoxizität der FP- und Yer<sup>+</sup>-immunisierten Zellen. Es besteht auch kein großer Unterschied, welches Lysat von den Zielzellen präsentiert wird, entscheidend für die Zytotoxizität scheint die Stimulation mit Bakterienantigenen zu sein.

Die Reaktion der stimulierten RK-PBL auf verschiedene EL (B27<sup>+</sup>)-Zielzellen zeigt keine besonderen Differenzen zwischen den unterschiedlich stimulierten Effektorzellen. Bei der Lyse der autologen Zellen fällt auf, daß die PHA-Blasten ohne weitere Bakterienantigene am besten lysiert werden. Es wäre möglich, daß durch die Bakterienlysate eine Population autoaggressiver Zellen unbekannter Spezifität stimuliert wird, deren Erkennungsdeterminante auf den Zielzellen durch präsen- tierte Lysatfragmente verdeckt wird, oder, wie schon erwähnt, PHA als Antigen fungiert und die Agglutinine durch Bakterienantigene verdeckt werden.

Während die Effektorzellen RK die Zielzellen EL nach jeder Stimulation gleichermaßen erkennen, zeigen die Effektorzellen GW eine etwas erhöhte Reaktion auf EL nach Stimulation mit FP. Die Stimulationen mit *Yersinia*-Lysaten erbringen keinen zytotoxischen Effekt. Auffallend ist jedoch auch hierbei, daß wieder die "nackten" PHA-Blasten bevorzugt erkannt werden. Die Zytotoxizität für RK zeigt äquivalente Ergebnisse, ist aber bei GW für die beiden Zielzellen, EL und RK, nicht besonders hoch, was vielleicht durch schlechtere Stimulation bedingt ist. Für genaue Vergleiche der Zytotoxizität hätte man die drei Effektorzellen auch mit allogenen Zellen stimulieren und die Lyse gleicher Zielzellen messen müssen. Entscheidend bei dem hier gezeigten Experiment war jedoch, zu zeigen, ob bestimmte Bakterienlysate besonders hohe Zytotoxizität generieren und ob vielleicht bestimmte Bakterien eine B27-spezifische Zytotoxizität, bedingt durch mögliche Kreuzreaktivitäten, induzieren können. Wichtig war hierbei für mich der Vergleich der Fusionsprotein-haltigen *E.coli*-Bakterien mit den plasmidtragenden *Yersinien*, von denen man weiß, daß sie einen krankheitsauslösenden Effekt haben können. Eine B27-spezifische Zellyse wurde nicht induziert, man kann aber sagen, daß der B27-positive Spender EL besonders gut vom FP-Lysat von *E.coli* stimuliert wird.

#### 2.3.4. Inhibition der B27-Zytotoxizität mit Fusionsproteinen

Ein weiterer Nachweis für die Erkennung der Fusionsproteine durch zytotoxische T-Zellen war der Versuch, die Lyse einer B27-positiven Zelllinie durch eine mit B27-Alloantigen stimulierte Kultur mit Fusionsproteinen zu inhibieren. Die Spenderzellen wurden einmal mit B27-positiven PBL stimuliert und nach 6 Tagen mit einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 15:1 auf der Zelllinie LG2 getestet. LG2 unterscheidet sich von den Effektorzellen WM in Klasse I nur durch B27. Außer den Fusionsproteinen wurden als mögliche Inhibitoren noch verschiedene monoklonale Antikörper, die mit den Fusionsproteinen oder dem B27-Antigen reagieren, untersucht. Die Fusionsproteine müssen als kompetitive Inhibitoren des B27-Antigens den T-Zell-Rezeptor der Effektorzellen blockieren, um eine Antigenerkennung auf den Zielzellen zu verhindern, während die monoklonalen Antikörper das B27-Antigen auf den Zielzellen binden und somit Erkennungsregionen für T-Zellen verdecken. Von den als Kulturüberstand eingesetzten monoklonalen Antikörpern MS6, MS10, MS17, MS32, MS39, MS62, TM 1-6, HC10 und W6.32 wurden in der nachfolgenden Figur nur diejenigen dargestellt, mit denen eine Inhibition der Zytotoxizität möglich war.

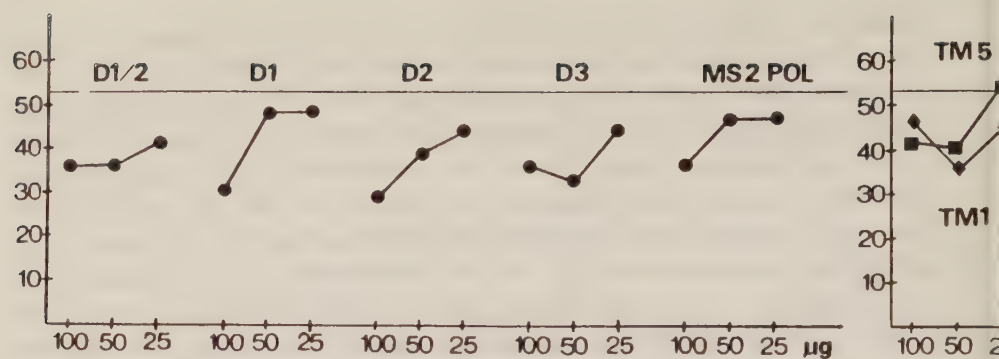


Abb.21: Inhibition der B27-spezifischen Zytotoxizität durch Fusionsproteine und monoklonale Antikörper.

Effektorzellen : WM HLA-A 2, B17, B61, Cw1, Cw6

Stimulatorzellen : Has HLA-A2, A3, B27, B37, Cw1

Zielzellen : LG2 HLA-A2, B27, Cw1

Verhältnis Effektorzellen : Zielzellen = 15:1

Anzahl der Zielzellen / Ansatz: 3000

Die durchgezogene Linie gibt die Lyse ohne Inhibitoren an.

Die y-Achse gibt die spezifische Lyse in % an, die X-Achse die eingesetzten Mengen an Fusionsprotein-Präparation bzw µl eingesetzten antikörperhaltigen Kulturüberstand.

Alle eingesetzten Fusionsproteine zeigten Inhibition der Lyse, von den monoklonalen Antikörpern als einzige TM5 und TM1, die HLA-B-Antigene (TM5: B5, B27, B13, B35, B44; TM1: B27) auf Zelloberflächen erkennen. Zur Reproduktion des Ergebnisses wurden die Effektorzellen ohne weitere antigenspezifische Stimulation, nur in IL2-haltigem Medium 21 Tage lang in Kultur gehalten und dann eine erneute Inhibition der Zytotoxizität versucht. Bei 3000 markierten Zielzellen (B-LCL LG2) wurden diesmal die Effektorzellen nur in 5fachem Überschuß eingesetzt. Die geringere Anzahl an Effektorzellen war deshalb möglich, da IL-2-Zugabe zu einer vorstimulierten Kultur zu einer Anreicherung der antigenspezifischen Zellen führt. Als Inhibitoren fungierten die MS2-Pol-Fusionsproteine D1/2, D1, D2, D3 und die MS2-Pol allein sowie die monoklonalen Antikörper TM5 und MS10 (als Negativkontrolle).

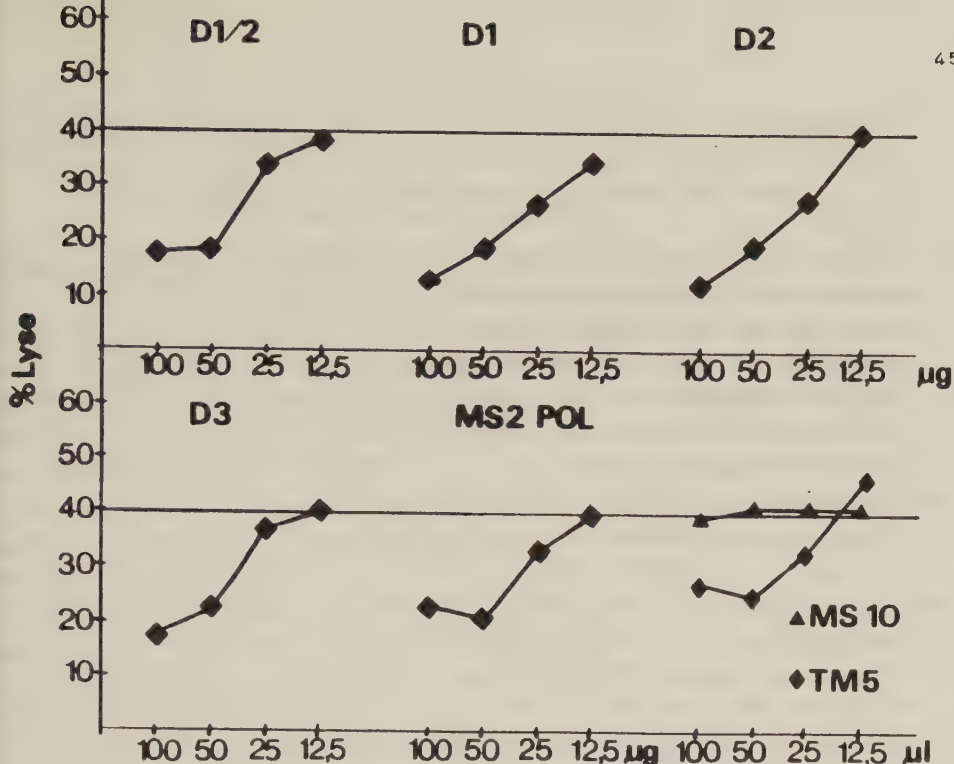


Abb.22: Inhibition der Zytotoxizität der T-Zelllinie WM (21 Tage nach einmaliger Antigenstimulation). Effektorzellen, Stimulatorzellen und Zielzellen wie bei Abb.21. Verhältnis Effektorzellen : Zielzellen = 5:1  
Anzahl der Zielzellen / Ansatz: 3000.  
Die durchgezogene Linie gibt wieder die spezifische Lyse ohne Inhibitor an.

Wie schon im ersten Experiment zeigt sich auch bei der Wiederholung, daß eine Inhibition der Zytotoxizität mit allen Fusionsproteinen und der Kontrollfraktion MS2 möglich ist. Dies könnte wiederum dafür sprechen, daß in der Bakterienpräparation Determinanten vorhanden sind, die mit B27 kreuzreagieren und diese Inhibition bewirken. Diese Kreuzreaktivität wurde auch schon unter 2.2.3. im Zusammenhang mit dem monoklonalen Antikörper MS39 diskutiert, der zwar alle FP-Fraktionen und Bakterienlysate bindet, aber dennoch spezifisch HLA-Antigene präzipitieren kann. Der Antikörper MS39 wurde im ersten Experiment mitgetestet, inhibierte aber nicht die Zytotoxizität. Der Antikörper TM5 zeigte auch diesmal Inhibition der Lyse, er erkennt auf Zelloberflächen nicht nur B27, sondern auch B6, B13, B35 und B44 und blockiert wahrscheinlich aufgrund sterischer Behinderung die Bindung des T-Zell-Rezeptors an das B27-Antigen.

### 3. DISKUSSION

#### 3.1. Diskussion der molekularbiologischen Arbeiten und der Fusionsproteine

Die Fusionsproteine sollten, ähnlich wie Peptide, eine Möglichkeit bieten, einzelne Bereiche des HLA-Antigens separat darzustellen. Da kurze Peptide von ca. 10 bis 20 Aminosäuren sich vermutlich anders falten als der äquivalente Bereich im nativen Protein, ergeben sich mit Peptiden vor allem bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern Probleme, da die Antigen-Antikörper-Bindung zumeist über dreidimensionale komplementäre Strukturen erfolgt. Peptide sind zwar im allgemeinen immunogen, besonders, wenn sie an Trägerproteine gekoppelt sind, peptidspezifische monoklonale Antikörper erkennen allerdings nur in sehr seltenen Fällen auch das native Molekül. Umgekehrt erkennen auch monoklonale Antikörper, die gegen definierte Abschnitte eines HLA-Moleküls gerichtet sind, oft keine Peptide der entsprechenden Region (Parham, 1987). Bei Virusantigenen scheint es eher möglich zu sein, monoklonale Antikörper, die sowohl Peptid als auch komplettes Virusantigen erkennen, zu finden (Cohen, 1984), im MHC-System gelingt dieses nur in Ausnahmefällen (Ada, 1985; Dr. Jullierat, Genf, pers. Mitteilung), meist nur mit polyklonalen Seren (Walker, 1985). Bei den Fusionsproteinen, die ungefähr eine ganze Domäne umfassen, erhoffte man, eine der nativen 3D-Struktur ähnliche Konformation zu erhalten. Voraussetzung für eine sinnvoll gegliederte Darstellung eines Moleküls in Form von Fusionsproteinen sind passende Restriktionsenzym-Schnittstellen auf der DNS für die Klonierung in einem Expressionsvektor. Man braucht Schnittstellen, die in der cDNS selten vorkommen und auch im Polylinker des Vektors zu finden sind, außerdem muß das Leseraster beibehalten werden. In meinem Fall konnte die vollständige 3. Domäne isoliert werden, mit passenden Restriktionsenzym-Schnittstellen am Anfang der Domäne und am Ende des cDNS-Klons und mit einem Translations-Terminationskodon am Ende der Domäne. Die Darstellungen der 1. und 2. Domäne waren wesentlich problematischer, da es keine verwendbare Schnittstelle zwischen den beiden Exons gab, der cDNS-Klon erst bei Aminosäure 29 in der 1. Domäne begann und die erste verwendbare Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende bei Aminosäureposition 37 lag. Aus wie schon erwähnten technischen Gründen umfaßt also das als D1 bezeichnete Fusionsprotein knapp 2/3 der ersten und 1/3 der zweiten Domäne, also auch die Region zwischen den beiden ersten Domänen, an der im nativen Molekül die Glykosylierung ansetzt. Das Fusionsprotein D2 besteht aus den verbleibenden 2/3 der 2. Domäne, das Fusionsprotein D1/2 beginnt wie D1 und endet wie D2, besteht also aus 2/3 der 1. und der gesamten 2. Domäne. In der 2. Domäne werden die Cysteine an Pos. 101 und 164 über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Da das Fusionsprotein D2 erst bei Aminosäure 114 beginnt, kann die Disulfidbrücke nicht ausgebildet werden,

die dreidimensionale Struktur des Anteils der 2. Domäne im Fusionsprotein ist demnach nicht stabilisiert wie im nativen Molekül, vielleicht sogar völlig anders gefaltet.

Nicht vorauszusehen, aber dennoch in Betracht zu ziehen, sind etwaige Wechselwirkungen der HLA-Antigen-Abschnitte mit dem fusionierten Bakterienprotein, es könnten sich neue Disulfidbrückenbindungen ergeben, die die Struktur des Moleküls völlig verändern. Durch die Faltung des Bakterienproteins werden möglicherweise auch Determinanten des HLA-Proteins verdeckt, zumal wenn das Bakterienprotein (wie die  $\beta$ Galaktosidase) fast die zehnfache Größe des MHC-Molekülabschnitts hat. Ein großes Problem der hier verwendeten Fusionsproteine ist deren Unlöslichkeit unter physiologischen Bedingungen. Diese Unlöslichkeit bietet Schutz vor Proteolyse und ermöglicht eine Anreicherung in bestimmten Fraktionen des Bakterienlysats (s.4.1.2.11.). Zwar sind die Fusionsproteine in 7M Harnstoff oder Detergentien löslich, dann aber nicht mehr für zelluläre Arbeiten einsetzbar.

Auch ist es nicht möglich, diese Fusionsproteine völlig von anderen Bestandteilen des Bakterienlysats zu isolieren, sodaß Störfaktoren und unspezifische Reaktionen durch undefinierte Bakterienproteine nicht auszuschließen sind.

Die Expression von Genen in Maus-L-Zellen (Fibroblasten) oder Mastrozytomzellen erleichtert zwar die Untersuchung ganzer Gene, nicht aber die Analyse einzelner Genabschnitte, wie es mit Fusionsproteinen aus bakteriellen Expressionsvektoren möglich wäre. Insofern wären Vektoren ideal, die nur das gewünschte Genprodukt in löslicher Form exprimieren, wobei man aber proteolytische Bakterienenzyme ausschalten muß. Probleme bereitet auch hierbei die Reinigung des gesuchten Proteins. Man kann aber selbst in einem solchen System nicht davon ausgehen, daß das Genprodukt tatsächlich immer löslich ist (pers. Mitteilung von Dr. Remaut, Ghent). Eine weitere Möglichkeit bieten eukaryontische *in vitro*-Translationssysteme, die aber weit weniger effektiv sind als die bakteriellen, da die Proteinausbeute wesentlich geringer ist. Als sinnvolle Alternative bieten sich lösliche Fusionsproteine an, deren bakterieller Proteinanteil über Antiseren gebunden und das gesamte Fusionsprotein somit isoliert werden kann. Anschließend wird der gewünschte Proteinanteil vom Fusionspartner abgespalten.

### 3.2. Monoklonale Antikörper gegen Fusionsproteine: Diskussion der Bindungsspezifitäten

Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, ist die Verwendungsmöglichkeit der hier synthetisierten Fusionsproteine eingeschränkt. Die Fusionsprotein-spezifischen Antikörper präzipitieren zwar HLA-Antigene aus Zell-Lysaten (2.2.6., 2.2.7.), erkennen aber keine nativen HLA-Antigene auf Zelloberflächen. Der einzige Antikörper, der

auf alle Zelloberflächen bindet, ist nicht spezifisch für ein Fusionsprotein, sondern offensichtlich gegen ein unbekanntes Bakterienprodukt gerichtet. Um die Bindung an ein Bakterienprodukt nachzuweisen, könnte man versuchen, mit diesem Antikörper (MS39) aus Bakterienlysaten das entsprechende Antigen zu isolieren und elektrophoretisch darzustellen. Falls MS 39 einen Glykosylrest erkennt, würde die Präzipitation von HLA-Antigenen aus Zellsaten mit diesem Antikörper durch Tunica-mycin-Behandlung verhindert, da Tunicamycin die intrazelluläre Glykosylierung von Proteinen blockiert.

Wie die Bindungsstudien der monoklonalen Antikörper zeigen, scheint das Fusionsprotein D2 weniger immunogen zu sein als die anderen Fusionsproteine. Das Fusionsprotein D1 enthält zwar nur 2/3 der ersten Domäne, dafür aber den Übergang zwischen der ersten und der zweiten Domäne, an dem im nativen, membranständigen Antigen auch der Glykosylrest ansetzt. Dieser Bereich könnte stark immunogen sein oder aber eine stabile dreidimensionale Konformation einnehmen, die in ähnlicher Form auch in der 3. Domäne vertreten ist (s.2.2.3. Bindungsstudien und Kreuzreaktivitäten der Antikörper). Die Untersuchung der Aminosäuresequenzen von D1 und D3 ergibt keine Homologien, denen man die Kreuzreaktivitäten der Antikörper zuschreiben könnte. Nach Geysen et al (1987) soll es ohnehin schwierig sein, eine bestimmte Peptidsequenz innerhalb eines Proteins einer Antikörperbindung zuzuordnen. Die Antigenität eines Proteinbereichs hängt von dessen Mobilität, der Packungsdichte, der Zugänglichkeit der Oberfläche und der Oberflächenexposition ab. Die Verdrängung des Hydratmantels ist eine wichtige Funktion bei der engen Interaktion komplementärer Proteinbereiche, sodaß konvexe Oberflächenformen engen grubenartigen Vertiefungen vorgezogen werden. Hydrophilie ist für hohe Antigenität weniger interessant, dafür aber umso mehr eine geringe Packungsdichte, die bei Antikörperbindung eine Verschiebung lokaler Seitenketten und somit eine verbesserte Anpassung der Proteine aneinander ("induced fit") ermöglicht. Durch Verschiebung von Seitenketten können auch Aminosäurereste an der Bindung beteiligt werden, die sonst verdeckt sind (Getzoff, 1987). Ähnliche Phänomene könnten vielleicht auch bei der Denaturierung von Proteinen (s. Fusionsproteine und HLA-Antigene im Zell-Lysat) auftreten, wobei durch Entfaltung des Moleküls verborgene Determinanten aufgedeckt werden.

HLA-Antigene müssen mit verschiedenen Proteinen interagieren: die Antigene der Klasse II mit Antigen, dem T-Zell-Rezeptor und dem CD4-Molekül, die Antigene der Klasse I außer mit (Virus-)Antigen und T-Zell-Rezeptor noch mit CD8 und dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin. Daher kann man vermuten, daß MHC-Moleküle mehrere Stellen besitzen, die den oben für Protein-Protein-Interaktionen beschriebenen entsprechen. Die Bindung der Antikörper an die erste und dritte Domäne könnte daraus resultieren, daß auf beiden Domänen Regionen durch Denaturierung sehr ähnlich werden. Offensichtlich entsprechen die B27-Antelle der Fusionsproteine denatu-

rierten HLA-Antigenen. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, weshalb die Antikörper zwar die Fusionsproteine und durch nichtionisches Detergenz wie NP40 denaturiertes HLA-Antigen, aber keine nativen Formen erkennen können.

Die Unfähigkeit aller vorgestellten anti-Fusionsprotein-Antikörper, auf dem Western Blot HLA-Antigene zu binden, könnte entweder mit zu starker Denaturierung durch SDS oder mit der Reduktion durch  $\beta$ -Merkaptoäthanol zusammenhängen.  $\beta$ Me als Ursache kann man fast ausschließen, da alle Antikörper auch die erste Domäne erkennen, die ohnehin nicht durch Disulfidbrücken stabilisiert ist. Die Tatsache, daß alle beschriebenen Antikörper HLA-Antigene aus detergentien behandelten Zellysaten isolieren können, spricht dafür, daß sie nur denaturierte Formen der HLA-Antigene erkennen können. Folglich scheinen die Fusionsproteine leicht denaturierten Formen von HLA-Molekülen zu entsprechen, die zwar noch für Klasse I-Antigene typische Determinanten besitzen, aber nicht mehr spezifisch für HLA-B27 sind.

### 3.3. Fusionsproteine als Antigene für T-Zellen

Durch Erkennung und Stimulation von T-Zellen mit Fusionsproteinen erhoffte man, weitere Erkenntnisse über die Erkennung von HLA-Antigenen zu gewinnen. Nach der Hypothese von Kourilsky und Claevery (1986) sollen T-Zellen ihre Antigene nur in Form von Peptiden und nicht als komplette Molekülstrukturen erkennen. Bei der Thymus-Passage lernen die T-Zellen, ein Set von Peptiden, die im eigenen Organismus vorkommen, als "somatisches Selbst" zu erkennen und nicht zu attackieren. Alle Peptide, die nicht dem "somatischen Selbst" entsprechen, werden als "nicht-Selbst" abgewehrt. Zu diesen "nicht-Selbst"-Peptiden gehören sowohl Bruchstücke von Virus-, Bakterien- als auch von fremden HLA-Antigenen (Alloantigene).

Wichtig für die Immunogenität ist einerseits die Präsentation des Antigens auf Selbst-MHC-Molekülen, andererseits müssen T-Zellen mit passendem Rezeptor vorhanden sein. Sowohl mangelnde Präsentation als auch ein "Loch" im T-Zell-Rezeptor-Repertoire kann zu einem Ausfall der Immunantwort und somit zur Toleranz führen. Nach Untersuchungen von Guillet et al (1987) soll bei der HLA-Restriktion von T-Helfer-Zellen für immunogene Peptide eine Aminosäuresequenz der Peptide einem Teil des entsprechenden restringierenden Klasse II-Antigens homolog sein. Diese Homologie darf sich aber nur auf kleine Bereiche von wenigen Aminosäuren des Klasse II-Moleküls erstrecken und vermittelt die "Selbst"-Erkennung. Unterschiede in benachbarten Regionen führen zu einer Erkennung als "Fremd" (oder "Allo") und zur T-Zell-Reaktion, Homologien in diesen Regionen werden als "Selbst" angesehen und induzieren Toleranz. Im "Normalzustand", d.h. ohne Zugabe von Fremdan antigenen, präsentieren die MHC-Antigene Fragmente des "Somatischen

Selbst", auf das die T-Zellen nicht reagieren. Bei Auftreten eines Fremdantigens wird das "Selbst-Antigen" durch das Fremdantigen ersetzt und wegen der Unterschiede zum "Selbst" von den T-Zellen erkannt. (s. Abb. 23)

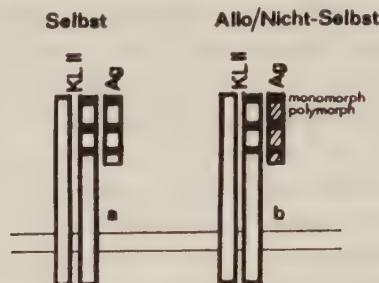


Abb.23: Modell zur Selbst/Fremd-Unterscheidung von T-Helfer-Zellen

a) Kl.II-Molekül mit "somatischem Selbst"; b) mit Fremdantigen

Ein Organismus wie z.B. eine Maus ist durchaus befähigt, zwischen "Selbst-Maus" (Auto), "Anders-Maus" (Allo) und "Nicht-Maus" zu unterscheiden. Der Fall der "Nicht-Maus" tritt ein, wenn eine zytotoxische Maus-T-Zelle mit einer menschlichen Zielzelle konfrontiert wird. Die Unterscheidung zwischen "Selbst-Maus" und "Anders-Maus" soll, wie bereits erwähnt, über den Homologievergleich der präsentierten Peptide durch den T-Zell-Rezeptor stattfinden, bei der Differenzierung zwischen Allo und "Nicht-Maus" könnte man eine Quantifizierung der Antigenunterschiede durch den T-Zell-Rezeptor oder aber eine wesentlich geringere Stabilisierung des MHC/Antigen/T-Zell-Rezeptor-Komplexes durch fehlende oder mangelhafte Interaktion des CD8-Moleküls mit dem MHC-Antigen annehmen.

Betrachtet man die Ergebnisse der T-Helfer-Stimulation mit Fusionsproteinen, so zeigt sich, daß bei beiden Effektorzellen das Fusionsprotein D1/2 bevorzugt erkannt wird, wobei in einem Fall Fusionsproteine mit  $\beta$ Gal, im anderen MS2-Pol-Fusionsproteine eingesetzt wurden. Der bakterielle Fusionspartner scheint also keinen Einfluß auf die Immunantwort der T-Helfer zu haben. Auffallend ist, daß beide Effektorzellen die Klasse II-Antigene DR1 und DQw1 haben. Entweder haben beide Spender zufällig in ihrem T-Zell-Rezeptor-Repertoire einen Rezeptor, der speziell eine Determinante auf dem von D1/2 repräsentierten B27-Abschnitt erkennt, oder aber DR1 oder DQw1 präsentieren ein Epitop von B27 zwischen Aminosäure 37 und 180 besonders gut. Da die Fusionsproteine D1 und D2 Teile von D1/2 darstellen, aber weniger effektiv stimulieren, könnte man annehmen, daß die Region um Aminosäure 114, der Schnittstelle zwischen den beiden Fusionsproteinen D1 und D2, die entsprechenden immunogenen Determinanten enthält.

Beim Versuch der Restimulation von Fusionsprotein-vorstimulierten Kulturen mit

B27-positiven und -negativen Zellen ging man davon aus, daß das B27-Antigen in Form von Peptiden präsentiert wird. Nicht bekannt ist, ob die B27-Peptide von den antigenpräsentierenden Zellen der Stimulator- oder denen der Effektor-Zell-Population präsentiert werden. Bei Klasse II-Identitäten zwischen Effektor- und Stimulatorzelle tritt sicherlich ein unterstützender Effekt durch Präsentation über die Klasse II-Antigene der Stimulatorzellen auf, der vielleicht auch bei der Restimulation mit der DQw1-positiven, B27-tragenden Stimulatorzelle eingetreten ist.

Das Modell von Guillet et al könnte man auch auf die Antigenerkennung von zytotoxischen T-Zellen übertragen. Nach heutigem Wissen werden bei der Allo-Erkennung die HLA-Klasse I-Antigene nicht per se erkannt, sondern sie fungieren, wie bei der Virusrestriktion, als Restriktionselemente für Klasse I-Peptide.

Experimente von Spouge et al (1987) über die Antigenizität von Peptiden für T-Helfer-Zellen haben ergeben, daß immunogene Peptide bestimmte Voraussetzungen erfüllen müssen. Besonders potent sind amphipathische Peptide, die sowohl einen hydrophilen als auch einen hydrophoben Anteil enthalten, ferner werden  $\alpha$ -Helix oder auch  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen im Gegensatz zu willkürlich geknäulten bevorzugt. Nach Guillet (1987) sollten außerdem gewisse Homologien zu den eigenen MHC-Antigenen vorhanden sein. (s. Abb. 23)

Wenn man annimmt, daß für zytotoxische T-Zellen ähnliche Voraussetzungen gelten könnten, wird die Anzahl an immunogenen Peptiden, in die sich ein Proteinmolekül zerlegen läßt, erheblich eingeschränkt. Nach der im Vergleich zu den Immunglobulinen relativ geringen Zahl an Gensegmenten für das T-Zell-Rezeptormolekül erwartet man ohnehin ein ziemlich beschränktes T-Zell-Rezeptor-Repertoire, das dennoch bei einer Vielzahl von Antigenen zwischen Selbst und Nicht-Selbst unterscheiden muß. Es ist nicht auszuschließen, daß die Degradation von verschiedenen Bakterien-, Virus-, MHC- und anderen Antigenen zu identischen oder sehr ähnlichen Peptiden führt, die vom T-Zell-Rezeptor entweder als Selbst oder Fremd eingestuft werden. Dies könnte die Korrelation von Krankheiten mit bestimmten HLA-Typen erklären, wenn nämlich Viren oder Bakterien als Peptide präsentiert werden, die dem somatischen Selbst ähneln oder gleichen und so entweder eine Toleranz gegenüber den Fremdan antigenen oder Autoaggression induziert wird. Die Alloreaktivität von Effektorzellen nach der Stimulation mit Bakterienprotein-kontaminierten Fusionsprotein-Fraktionen könnte mit dieser Theorie erklärt werden. Die Bakterienlysate werden zu MHC-ähnlichen Peptiden prozessiert und induzieren somit eine Alloreaktion. Diese Alloreaktion ist spezifisch für humane Klasse I-Antigene, wie durch die Lyse der B27-tragenden Maus-Mastozytomlinie nach Stimulation mit Bakterienlysaten gezeigt wird. Die Lyse der Mauszelle ohne humanes Klasse I auf der Oberfläche ist wesentlich geringer. Zytotoxische T-Zellen können aber auch Glykosylierungen als antigene Determinanten erkennen (Pimlott, 1986), sodaß eine bakterielle Glykosylierungsstelle der auf HLA-Klasse I-Molekülen gleichen könnte

und somit Bakterienlysate-Proteine mit Zuckerresten die unspezifische Alloreaktivität und auch die Inhibition der Zytotoxizität hervorrufen. Einflüsse der Glykosylierungen wurden auch schon für die Bindungsspezifitäten der monoklonalen Antikörper diskutiert.

Bei der Anwendung der Fusionsproteine als Antigene für T-Zellen sollte die Unlöslichkeit keine Rolle spielen, da der Antigenerkennung ohnehin die Aufnahme und Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen vorausgehen muß. Da in vivo auch Bakterien und unlösliche Membranpartikel aufgenommen und zerkleinert werden, konnte man davon ausgehen, daß dies auch mit den Fusionsprotein-Partikeln möglich sein würde. Neben vielen bakterienspezifischen Peptiden sollten bei der Prozessierung auch immunogene Peptide vom B27-Anteil der Fusionsproteine gebildet werden, die analog einer Allostimulation, bei der man auch eine Präsentation von Peptiden degradierter HLA-Antigene vermutet, den T-Zellen vorgeführt werden.

Die Lymphozyten der Spender DJS und GW wurden sowohl für Stimulationen der T-Helfer-Population als auch für die Generation von zytotoxischen T-Zellen verwendet. Bei beiden Spendern reagieren die Helfer-Zellen spezifisch auf das Fusionsprotein D1/2, die zytotoxischen T-Zellen jedoch auf alle Bakterienlysate.

Es wäre möglich, daß der Prozessierungs- und Präsentationsmechanismus für Klasse I für die zytotoxischen T-Zellen weniger effizient ist als der für Klasse II und daher antigene Determinanten aus den Fusionsproteinen quantitativ und/oder qualitativ unterschiedlich isoliert werden. So könnte es sein, daß bestimmte Regionen der Fusionsproteine tatsächlich eine B27-spezifische Zytotoxizität generieren könnten, aber nicht effizient präsentiert werden.

Zusammenfassend wäre zu sagen, daß Fusionsproteine in der hier verwendeten Form sowohl für die Herstellung monospezifischer monoklonaler Antikörper als auch für Experimente mit zytotoxischen T-Zellen nicht geeignet sind. Aufgrund noch in den Präparationen enthaltener Bakterienproteine weiß man weder, welche Determinanten für eine Reaktion verantwortlich sind, noch kann man die Nettomenge des eingesetzten Fusionsproteins exakt bestimmen. Vielleicht kann man mit löslichen, hochgereinigten Fusionsproteinen bessere Aussagen erhalten, vielleicht sind aber Fusionsproteine, die eine ganze HLA-Domäne umfassen, sogar noch zu groß, um antigene Determinanten genau zu analysieren.

Zumindest für die Bindung von Antikörpern scheint eine dreidimensionale Struktur, die dem nativen Antigen ähnelt oder gleicht, erforderlich zu sein. Demnach wären für einen solchen Ansatz Fusionsproteine der hier verwendeten Größe als Antigene besser geeignet als kleine Peptide. Die Fusionsproteine sollten aber löslich und nicht denaturiert sein, um spezifische antigene Determinanten zu bewahren.

Nach Experimenten von Ozato (1983) und Arnold (1984, 1985) spielt auch für die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen die dreidimensionale Konformation der MHC-Antigene eine entscheidende Rolle. Bei diesen Experimenten wurden durch gezielten

Austausch von Exons verschiedener H2-Allele (Maus-Klasse I) neue Hybridgene und somit Hybridmoleküle erzeugt (Evans, 1980). Mit spezifischen alloreaktiven zytotoxischen T-Zellen wurden dann die Antigenität der Hybridmoleküle und die funktionell wichtigen Erkennungsbereiche für zytotoxische T-Zellen untersucht. Es stellte sich heraus, daß die  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ -Domänen gemeinsam die für die Erkennung und Lyse wichtigen Determinanten bilden. Arnold (1984) und Mitarbeiter postulierten außerdem die Bedeutung der  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ -Domänen für die (Influenza-) Virus-restringierte Erkennung.

Diese Experimente klären aber nicht, ob das Antigen selbst eine bestimmte dreidimensionale Konformation haben muß, um von den zytotoxischen T-Zellen erkannt zu werden, oder ob die beschriebene notwendige Konformation nur für die Anlagerung und Präsentation des Antigens obligatorisch ist. Es wurde angenommen, daß im Fall einer konformationsabhängigen antigenen Determinante die Fusionsproteine zur Lokalisierung und Analyse gut geeignet wären.

Auch die Arbeitsgruppe von Parham et al. (1987) schließt die Notwendigkeit einer dreidimensionalen Struktur für die Erkennung durch T-Zellen nicht aus, obwohl sie durch Inhibitionsexperimente mit Peptiden zeigten, daß auch degradierte Formen der HLA-A2-Antigene von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Dies könnte auch einen Spezialfall des HLA-A2-Antigens darstellen, denn die Peptide stellen einen Bereich des Antigens dar, in dem auch die Unterschiede zwischen den einzelnen A2-Subtypen liegen, die sehr leicht von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden.

Für HLA-B-Antigene und speziell für HLA-B27 wurden derartige Ergebnisse noch nicht veröffentlicht, vielleicht ist die Erkennung von B27 stark konformationsabhängig, sodaß sogar die Fusionsproteine als Imitation des nativen Antigens zu sehr denaturiert sind. Da diese Arbeit den ersten Versuch darstellt, mit Fusionsproteinen eine HLA- bzw. HLA-B27-spezifische Immunantwort zu induzieren, waren auch keinerlei Vergleiche mit der Literatur möglich.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. Molekularbiologische Arbeiten

#### 4.1.1. Material

##### 4.1.1.1. Abkürzungen

|       |                                                         |
|-------|---------------------------------------------------------|
| Amp   | Ampizillin                                              |
| ATP   | Adenosin -5'-Triphosphat                                |
| bp    | Basenpaar(e)                                            |
| cDNS  | komplementäre DNS                                       |
| cpm   | Impulse pro Minute                                      |
| CTP   | Cytidin -5'-Triphosphat                                 |
| dATP  | Desoxy -ATP                                             |
| dCTP  | Desoxy -CTP                                             |
| dGTP  | Desoxy -GTP                                             |
| dTTP  | Desoxy -TTP                                             |
| DNase | Desoxyribonuklease                                      |
| ds    | Doppelstrang                                            |
| DTT   | Dithiothreitol                                          |
| EDTA  | Ethylendiaminetetraacetat                               |
| GTP   | Guanosin -5'-Triphosphat                                |
| IPTG  | Isopropyl- $\beta$ -D-thio-Galaktopyranosid             |
| kb    | Kilobasen                                               |
| MOPS  | Morpholinopropansulfonsäure                             |
| NP 40 | Nonidet P 40                                            |
| NTP   | A, C, G oder T                                          |
| PBS   | Phosphat-Salinepuffer                                   |
| RNase | Ribonuklease                                            |
| rpm   | Umdrehungen pro Minute                                  |
| SDS   | Natriumlaurylsulfat                                     |
| ss    | Einzelstrang                                            |
| TBE   | Tris-Borat-EDTA -Puffer                                 |
| TE    | Tris-EDTA -Puffer                                       |
| TEMED | NNN'-Tetramethyläthylendiamin                           |
| Tris  | Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan                         |
| TTP   | Thymidin -5'-Triphosphat                                |
| x-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid |

#### 4.1.1.2. Chemikalien

|                                 |                             |
|---------------------------------|-----------------------------|
| Agarose Typ II medium EEO       | Sigma, München              |
| Ampizillin                      | Sigma, München              |
| Bacto Agar                      | Difco, Detroit              |
| Blue-Gal                        | BRL, Gibco, Karlsruhe       |
| Caesiumchlorid                  | BRL, Gibco, Karlsruhe       |
| DTT                             | Sigma, München              |
| dATP                            | Pharmacia, Freiburg         |
| dCTP                            | Pharmacia, Freiburg         |
| dGTP                            | Pharmacia, Freiburg         |
| dTTP                            | Pharmacia, Freiburg         |
| Ethidiumbromid                  | Sigma, München              |
| Ficoll 400                      | Sigma, München              |
| Harnstoff p.a.                  | BRL, Gibco, Karlsruhe       |
| Hefeextrakt                     | Difco, Detroit              |
| IPTG                            | Sigma, München              |
| Kallumazetat                    | Fluka, Buchs Schweiz        |
| Kanamycin                       | Sebio, Walchasing           |
| Molekulargewichtsstandard (1kb) | BRL, Gibco, Karlsruhe       |
| Nitrozellulosefilter            | Schleicher & Schüll, Dassel |
| Nonidet P 40                    | Sigma, München              |
| SDS                             | Sigma, München              |
| Trypton                         | Difco, Detroit              |
| TEMED                           | Sigma, München              |

Alle übrigen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

#### 4.1.1.3. Radiochemikalien

|                                  |                        |
|----------------------------------|------------------------|
| 32P $\alpha$ -dATP (3000 Ci /mM) | Amersham, Braunschweig |
|----------------------------------|------------------------|

#### 4.1.1.4. Enzyme

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| Asp 718                                | Boehringer |
| Bam HI                                 | Boehringer |
| DNS -Polymerase I<br>(Klenow Fragment) | Boehringer |
| DNase                                  | Boehringer |
| Eco RI                                 | Boehringer |
| Hind III                               | Boehringer |
| Kpn I                                  | Boehringer |
| Pst I                                  | Boehringer |
| RNase A                                | Genofit    |
| Sal I                                  | Boehringer |
| T4 -DNS -Ligase                        | Boehringer |

Eine Einheit eines Enzyms bezeichnet die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg Substrat in einer Stunde umzusetzen. .

#### 4.1.1.5. Vektoren

|           |                                               |
|-----------|-----------------------------------------------|
| pPLcAT 10 | Geschenk von Dr. Remaut, Gent                 |
| M13 mp 10 | Pharmacia                                     |
| pEX 1     | Geschenk von Dr. Stanley<br>EMBL, Heidelberg  |
| pEX 10    | Geschenk von Dr. Röwekamp<br>DKFZ, Heidelberg |

#### 4.1.1.6. Bakterienstämme

|                                                                                                                                |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| JM101 (E.coli)supE, thi, delta(lac-proAB), (F', traD36, proAB, lacIqZ delta M15)                                               |  |
| DK 1 (E.coli)F <sup>-</sup> , recA <sup>-</sup> , endA <sup>-</sup> , gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA <sup>-</sup> , lambda- |  |
| POP (E.coli)F <sup>-</sup> , recA <sup>-</sup> , kodiert einen temperatursensitiven Repressor der β Galak-                     |  |
| tosidase                                                                                                                       |  |
| W6 (E.coli)F <sup>-</sup> , recA <sup>-</sup>                                                                                  |  |
| 537 (E.coli)F <sup>-</sup> , recA <sup>-</sup> , kodiert auf separatem Plasmid mit Kanar <sup>r</sup> , einen                  |  |
| temperatursensitiven Repressor der MS2-Polym.                                                                                  |  |

#### 4.1.1.7. Fotomaterialien

|                  |             |          |
|------------------|-------------|----------|
| Röntgenfilme     | : X -Ray 90 | Linhart  |
| Verstärkerfolien | : MR 400    | Linhart  |
| Polaroidfilme    | : Typ 667   | Polaroid |

#### 4.1.1.8..Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

% Feststoffeinwaagen beziehen sich immer auf w/v

% Flüssigkeit auf v/v

Für alle Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

#### Bakterienkulturmedien (E. coli)

##### LB -Medium :

|     |   |             |
|-----|---|-------------|
| 1   | % | Trypton     |
| 0.5 | % | Hefeextrakt |
| 1   | % | NaCl        |

##### LB -Agar :

|     |   |             |
|-----|---|-------------|
| 1   | % | Trypton     |
| 0.5 | % | Hefeextrakt |
| 1   | % | NaCl        |
| 1.2 | % | Bacto Agar  |

##### TYM -Medium :

|     |    |                   |
|-----|----|-------------------|
| 2   | %  | Trypton           |
| 0.5 | %  | Hefeextrakt       |
| 0.5 | %  | NaCl              |
| 10  | mM | MgCl <sub>2</sub> |
| (20 | mM | Glukose)          |

##### H-Medium:

|     |   |                |
|-----|---|----------------|
| 1.0 | % | Bacto Tryptone |
| 0.8 | % | Natriumchlorid |

H-Platten : H-Medium plus 1% Bacto Agar

H-Top Agar : H-Medium plus 0.8 % Bacto Agar

#### Minimalmedium:

|     |    |                           |
|-----|----|---------------------------|
| 34  | mM | Dinatriumhydrogenphosphat |
| 22  | mM | Kaliumhydrogenphosphat    |
| 18  | mM | Ammoniumchlorid           |
| 9   | mM | Natriumchlorid            |
| 1   | mM | Magnesiumsulfat           |
| 0.1 | mM | Kalziumchlorid            |
| 1.0 | mM | Thiaminhydrochlorid       |
| 0.2 | %  | Glukose                   |

Minimalplatten: Minimalmedium plus 1.5% Bacto Agar

Für die Selektion auf Antibiotika wurde den Medien bzw Platten folgende Endkonzentrationen an Antibiotika beigelegt :

|            |            |
|------------|------------|
| Ampizillin | : 50 µg/ml |
| Kanamycin  | : 50 µg/ml |

#### Einfriermedium für E. coli (2fach konz.):

|     |    |                       |
|-----|----|-----------------------|
| 50  | mM | $K_2HPO_4$            |
| 25  | mM | $KH_2PO_4$            |
| 3   | mM | Na-Zitrat             |
| 0.6 | mM | $MgSO_4 \times 7H_2O$ |
| 90  | mM | $(NH_4)_2SO_4$        |
| 8.8 | %  | Glyzerin              |

#### Allgemeine Puffer

##### PBS -Puffer (Phosphat-Salinepuffer)

|     |    |                           |
|-----|----|---------------------------|
| 150 | mM | NaCl                      |
| 3   | mM | KCl                       |
| 8   | mM | $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ |
| 1.5 | mM | $KH_2PO_4$                |

##### TE -Puffer (pH 7.5 oder pH 8.0) :

|    |    |                      |
|----|----|----------------------|
| 10 | mM | Tris/HCl pH 7.5, 8.0 |
| 2  | mM | EDTA                 |

**TBE Puffer:**

|    |    |                 |
|----|----|-----------------|
| 90 | mM | Tris-HCl pH 8.0 |
| 90 | mM | Borsäure        |
| 2  | mM | EDTA            |

**Phenol (pH 8.0) :**

Destilliert

Ausschütteln mit 0.1 M Tris /HCl pH 10 bis Phenol pH 8.0 aufweist.

**4.1.2. Methoden**

Um unerwünschte Degradation der DNS durch unbeabsichtigt eingeschleuste DNAsen zu vermeiden, werden nur autoklavierte Lösungen und Geräte sowie autoklavierte Gefäße verwendet.

**4.1.2.1. Herstellung kompetenter Bakterienstämme**

Eine bestimmte Vorbehandlung ist erforderlich, um Bakterien die Aufnahme von DNS zu ermöglichen. Eine dieser Methoden wird hier beschrieben.

Medien:

**Tfb I (steril filtrieren):**

|     |    |                   |
|-----|----|-------------------|
| 30  | mM | KOAc              |
| 50  | mM | MnCl oder RbCl    |
| 100 | mM | KCl               |
| 10  | mM | CaCl <sub>2</sub> |
| 15  | %  | (w/v) Glyzerin    |

**Tfb II (steril filtrieren):**

|    |    |                   |
|----|----|-------------------|
| 10 | mM | Na-MOPS pH 7.0    |
| 75 | mM | CaCl <sub>2</sub> |
| 10 | mM | KCl               |
| 15 | %  | (w/v) Glyzerin    |

#### **TYM-Medium (autoklavieren):**

|      |   |                                          |
|------|---|------------------------------------------|
| 2.0  | % | Bacto-Tryptone                           |
| 0.5  | % | Bacto Yeast Extract                      |
| 0.1  | M | NaCl                                     |
| 0.01 | M | MgCl <sub>2</sub> oder MgSO <sub>4</sub> |

Eine 5ml Übernacht-Bakterienkultur wird in 100ml TYM-Medium überimpft und bei entsprechender Temperatur (normalerweise 37°C, bei Stämmen mit thermosensitivem Repressor 30°C) bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.9 bis 1.2 aufgezogen.

Die Zellen werden in zwei 50ml-Röhrchen im SS 34-Rotor bei 3000rpm für 10-12 Min. abzentrifugiert.

Der Überstand wird entfernt und das Sediment in 30-40ml pro 100ml Anfangskultur in Tfb I suspendiert und für 5-10 Min. auf Eis gestellt.

Die Zellsuspension wird für 8 Min. bei 3000rpm und 4°C abzentrifugiert.

Das Sediment wird in 4ml Tfb II (pro 100ml Anfangskultur) vorsichtig resuspendiert. Die Bakterien werden in Portionen von je 100µl bei -80°C eingefroren.

#### **4.1.2.2. Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien**

100µl kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und anschliessend zu 5µl Plasmid-DNS (max.25ng DNS) in ein 10ml-Polypropylenröhrchen mit Rundboden pipettiert. Danach wird 1 Std. auf Eis inkubiert.

Die Bakterien werden dann für 45 oder 60 Sek. einer Hitzebehandlung bei 42°C ausgesetzt. Danach gibt man 900µl Tym-Medium dazu und inkubiert bei 37°C (bei Bakterien mit thermosensitivem Repressor 30°C) für eine Stunde, ohne zu schütteln. In dieser Zeit können die Bakterien die auf dem Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz ausbilden.

Die Bakterien werden dann bei 2500rpm für 5 Min. abzentrifugiert, der Überstand wird bis auf 50µl entfernt, mit dem Sediment resuspendiert und auf Agarplatten mit Antibiotika ausplattiert. Nur die Bakterien überleben, die auch das Plasmid aufgenommen haben. Die Platten werden über Nacht bei entsprechender Temperatur inkubiert, die Kolonien können am nächsten Tag gepickt werden.

#### 4.1.2.3. Präparation der Plasmid-DNS

(Ish-Horowicz 1981)

##### 4.1.2.3.1. Kleinsatz

Der Kleinsatz ist eine Methode, um schnell DNS zur Analyse des jeweiligen Plasmids zu erhalten.

Zunächst impft man 5-7ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie an und läßt die Kultur über Nacht hochwachsen. Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen, das Bakteriensediment in 200µl Glukose-Puffer (50mM Glukose, 10mM EDTA, 25mM Tris/HCl pH 8.0) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Unter vorsichtigem Schütteln werden 400µl 0.2M NaOH/1% SDS zugegeben und für 5 Min. auf Eis gestellt. Bei diesem Schritt werden die Bakterien lysiert.

Dann werden 200µl 3M KAc pH 4.8 zugegeben, gut geschüttelt und wieder für 5 Min. auf Eis gestellt. Dies dient dazu, Proteine, Kohlenhydrate, Fette und chromosomale DNS auszufällen.

Nach 15minütiger Zentrifugation wird der plasmidhaltige Überstand vorsichtig abgenommen und in ein anderes Reaktionsgefäß überführt, anschließend wird er mit 500µl Isopropanol versetzt und wiederum für 15 Min. auf Eis gestellt. Die niedermolekulare Plasmid-DNS wird hierbei durch den hohen Salzgehalt der Lösung präzipitiert und kann durch nachfolgende 10 Min.-Zentrifugation abgetrennt werden. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 70%igem Äthanol gewaschen. Nach abermaligem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und die DNS in 50µl  $\approx$  20 gelöst. Die DNS-Ausbeute beträgt ca. 10µg.

##### 4.1.2.3.2. Großansatz

Für präparative Zwecke, wenn größere DNS-Mengen benötigt werden, wird man auf den Großansatz zurückgreifen. Dafür werden Bakterien in 1l LB-Kulturmedium mit Antibiotika angelimpft.

Die Übernacht-Kultur wird zunächst auf Eis gekühlt, um vorzeitige Lyse der Bakterien beim Zentrifugieren zu verhindern. Dann wird die Kultur für 10 Min. bei 4°C und 4000rpm (Sorvall) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 40ml Glukosepuffer suspendiert. Nach langsamer Zugabe von 80ml 0.2M NaOH/ 1% SDS und Inkubation von 5 Min. auf Eis werden 40ml KAc zugegeben. Für eine optimale Präzipitation wird wieder 15 Min. auf Eis inkubiert. Nach 30 Min. Zentrifugation bei 4° und 13000rpm wird der Überstand durch sterile Gaze filtriert.

6

Zu dem Filtrat werden 96ml Isopropanol gegeben und mindestens 1 Std. auf Eis inkubiert oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  auf Trockeneis eingefroren. Danach wird wieder für 30 Min. bei 13000rpm (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert, das Sediment mit 70%igem Äthanol gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 7-8ml TE-Puffer (pH 7-8) gelöst. Nach Zugabe von 10g Caesiumchlorid (zur Bildung eines Dichtegradienten von 1.55g/ml) und 1mg Ethidiumbromid (zur Anfärbung und Auftrennung der DNS-Bande) wird die Lösung in versiegelbare Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und im T170-Rotor bei  $15^{\circ}\text{C}$  und 55000rpm für mind. 16 Std. zentrifugiert. Dabei wird die erwünschte Form (supercolled) Plasmid-DNS von defekter Plasmid-DNS, restlicher chromosomaler DNS und RNS getrennt und bildet eine gut sichtbare Bande im Gradienten. Diese Bande wird mit einer Spritze abgezogen, mit 3-4fachem Volumen Wasser verdünnt und mit Phenol-Chloroform gereinigt.

Zur Mengenbestimmung wird die Extinktion der DNS bei 260nm gemessen und der Wert mit dem Faktor 50 (Extinktionskoeffizient) multipliziert, woraus man den DNS-Gehalt in  $\mu\text{g/ml}$  erhält.

#### 4.1.2.4. Phenolisieren der DNS

Durch Phenolisieren werden verunreinigende Proteine von der DNS abgetrennt. Dazu gibt man zur gelösten DNS das gleiche Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und schüttelt gut. Von den durch anschließende Zentrifugation getrennten Phasen wird die obere, wäßrige, die die DNS enthält, abgenommen und mit 1/10 Vol 3M NaAc versetzt. Nach Zugabe von 2 Vol absolutem Äthanol wird der Ansatz auf Trockeneis eingefroren. Danach wird für 10 Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und ein eventuell sichtbares Sediment mit 70%igem Äthanol gewaschen, erneut zentrifugiert und die gewaschene bleibende DNS in TE-Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die DNS wird bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (Plasmid-DNS) oder  $4^{\circ}\text{C}$  (genomische DNS) aufbewahrt.

#### 4.1.2.5. Verdau der DNS mit Restriktionsenzymen

Die Endonukleasen vom Typ II sind befähigt, bestimmte DNS-Sequenzen zu erkennen und zu restringieren, d.h. zu schneiden. Bei der hydrolytischen Spaltung mit Hilfe solcher Restriktionsendonukleasen können drei verschiedene Arten von Endungen der Doppelstrang-DNS entstehen: glatte Enden und bei versetzter Spaltung überhängende 5' oder 3'-Enden.

Die Bedingungen für die optimale Aktivität der Enzyme wie Pufferzusammensetzung, Salzkonzentration und Temperatur können den jeweiligen Beschreibungen der Lieferfirmen werden. Bei der einzusetzenden Enzymmenge ist zu beachten, daß 1U eines Restriktionsenzym 1µg DNS in 1 Std. bei 37°C schneidet.

Beim Restriktionsverdau von Plasmid-DNS, die durch Minipräparation erhalten wurde und somit nicht RNS-frei ist, muß gegen Ende der Inkubationszeit noch RNase A (ca 20µg pro Ansatz) zugegeben werden, da die RNS bei der elektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsfragmente die kleinen DNS-Fragmente überdeckt.

#### 4.1.2.6. Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten (McDonell 1977)

Zur Größenauftrennung der durch Restriktionsenzymverdau erhaltenen DNS-Fragmente wurden horizontale, in TBE-Puffer mit 25ng/ml Ethidiumbromid untergetauchte Agarosegele (0.7-1% Agarose in TBE-Puffer) verwendet. Die angelegte Spannung beträgt im allgemeinen 50-100V. Das im Laufpuffer enthaltene Ethidiumbromid lagert sich in die DNS-Helix ein und zeigt die DNS-Banden im UV-Licht rot gefärbt, vermindert aber gleichzeitig ihre Laufgeschwindigkeit.

#### 4.1.2.7. Elektroelution der DNS-Fragmente

Die im Agarosegel aufgetrennten DNS-Fragmente können im UV-Licht (340nm) mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Nach weiterer Zerkleinerung des Agaroseblocks wird die DNS aus diesem in einer Elutionskammer eines "ISCO-Electrophoretic Concentrators" in TBE-Puffer bei 100-200V für 1-2 Std. eluiert.

#### 4.1.2.8. Auffüllreaktion (Drouin 1980)

Bei der Auffüllreaktion werden 5'überhängende Enden eines Restriktionsenzym-Fragmentes mit Hilfe der Klenow-Polymerase und zugefügten Nukleotiden aufgefüllt und zu somit glatten Enden. Diese Reaktion wurde ursprünglich bei der Maxam-Gilbert-Sequenzierreaktion verwendet, um die DNS radioaktiv zu markieren. Mit dieser Methode ist es aber auch möglich, DNS-Enden mit nicht kompatiblen Überlappungen zu verbinden oder um Verschiebungen im Leseraster zu erhalten, was bei Klonierungen für Expressionszwecke besonders wichtig sein kann.

Für die Auffüllreaktion werden die DNS, 10x Klenow-Puffer (100mM Tris pH 8.5, 50mM MgCl<sub>2</sub>), 0.5mM dNTP sowie Klenow Polymerase gemischt und 30 Min. bei

Raumtemperatur inkubiert.

#### 4.1.2.9. Ligation

Bei der Ligation von Vektor- und einzubauendem DNS-Fragment werden die passenden DNS-Enden zusammengefügt und kovalent verbunden. Man setzt die zu insertierende DNS in einem 5fachen molaren Überschuß zu Vektor-DNS ein, dazu 5facher Ligase-Puffer (0.1M Tris pH7.5, 0.05M  $MgCl_2$ , 50mM DTT, 10mM ATP) und 0.01U T4-Ligase/ $\mu$ l. Die Inkubation erfolgt bei 15°C für 3 Std. bei überlappenden Enden, bei glatten Enden über Nacht. Das Volumen beträgt 5-10 $\mu$ l.

#### 4.1.2.10. DNS-Sequenziermethode nach Sanger (Sanger 1977)

Das Prinzip der Sequenziermethode nach Sanger besteht darin, daß ein DNS-Einzelstrang enzymatisch zu einem Doppelstrang komplettiert wird, wobei nach Einbau von Dideoxy-NTP-Analogen eine weitere Strangverlängerung abgebrochen wird. Durch Kombination dieses Verfahrens für alle vier Nukleotide läßt sich auf einem Polyacrylamidgel die Sequenz des jeweiligen DNS-Abschnitts lesen.

##### 4.1.2.10.1. Subklonieren in M13-Phagen (Messing 1977, 1982)

Die zu sequenzierenden DNS-Fragmente werden in die ds-DNS der Phagenvektoren mp8, mp10 oder mp11 (replikative Form) eingebaut. Dabei werden zu klonierende-DNS und Phagen-DNS mit Restriktionsenzymen geschnitten, wobei entweder überhängende kompatible oder glatte Enden entstehen. Die Ligation erfolgt wie in 4.1.2.9. beschrieben.

##### 4.1.2.10.2. Kompetenzinduktion beim E.coli Stamm JM101

JM101-Zellen werden auf Glukose-Minimalmedium-Platten ausgestrichen. Eine Einzelkolonie wird über Nacht in 2xTY-Medium aufgezogen, davon werden 2ml in 80ml TY-Medium angelpft. Nachdem die Zellen bis zu einer  $OD_{550}$  von 0.3 hochgewachsen sind, kühlt man sie auf Eis und zentrifugiert sie ab. Das Sediment wird in einem halben Ausgangsvolumen eiskalter 50mM  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 30Min. auf Eis stehen gelassen. Nach erneuter Zentrifugation nimmt man die Zellen in 1/10 Vol derselben Lösung auf. Die Zellen werden entweder sofort weiter-

verarbeitet oder bei 4°C über Nacht aufbewahrt.

#### 4.1.2.10.3. Transformation

200µl kompetente Zellen werden mit 5µl Ligationsansatz zusammen für 40Min. auf Eis inkubiert. Als Kontrollen werden nicht ligierter und ligierter Vektor transformiert. Nach einem Hitzeschock von 3Min. bei 42°C werden die Bakterien bis zum Ausplattieren wieder auf Eis gestellt. Während der Transformation wird eine Übernacht-Kultur von JM101-Zellen 1:100 verdünnt und genau 1Std. bei 37°C geschüttelt.

Pro Transformationsansatz werden 200µl JM101 (1:10-Verd.), 50µl X-Gal (0.8mg/50µl Dimethylformamid) und 30µl IPTG (0.95mg in  $\mu$ 2O), frisch angesetzt, zusammen mit 3ml flüssigem Top-Agar (42°C) und dem Transformationsansatz gemischt und auf H-Agarplatten gegossen.

#### 4.1.2.10.4. Selektion von Transformanten auf rekombinante DNS

Die transformierten M13-Phagen werden von den Bakterien sezerniert und befallen weitere, nicht transformierte Bakterien im Top-Agar, welche dadurch in ihrem Wachstum gestoppt werden. Dadurch entstehen durchsichtige Plaques im trüben Bakterienrasen. Die Klonierungsregion (Linker) der Phagen liegt mitten im Gen für  $\beta$ -Galaktosidase, einem Enzym, das bei Anwesenheit des Induktors IPTG synthetisiert wird und das Substrat X-Gal hydrolysiert, was zu einer blauen Farbreaktion führt. Hat man ein DNS-Fragment erfolgreich in den Phagen kloniert, so wird das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen zerstört und die Farbreaktion kann somit nicht stattfinden. Folglich enthalten farblose Plaques rekombinante DNS, während blaue Plaques nur den M13-Vektor enthalten.

#### 4.1.2.10.5. Isolierung von M13-Einzelstrang-DNS (Messing 1977)

Eine Übernacht-Kultur von JM101 wird 1:100 in TY-Medium verdünnt und je 1.5ml davon werden mit einem Plaque beimpft. Pro Transformation sollten mindestens 3 Plaques überimpft werden. Als Vektorkontrolle wird eine blaue Kolonie mit angeimpft. Nach einer Inkubation von 5 Std. bei 37°C werden die Bakterien bei 5000rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Nach

einer weiteren Zentrifugation wird der Überstand wieder in ein neues Röhrchen überführt, dazu werden 200µl 20% PEG 6000 in 2.5M NaCl gegeben und 15 Min. bei RT stehengelassen. Nach erneutem Zentrifugieren wird der Überstand sorgfältig abgenommen und verworfen. Die Phagen werden in 100µl TE gelöst, phenolisiert, mit 10µl 3M NaAc und 2.5Vol Athanol über Nacht bei -20°C präzipitiert und mit Athanol gewaschen. Das letzte Sediment wird in 50µl TE gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

#### 4.1.2.10.6 Bindung des M13 Primers an die ss-DNS (Annealing)

Das Klenow-Polymerase-Fragment, welches die Sequenzierreaktion durchführt, benötigt zur Ergänzung eines Doppelstrangs den Einzelstrang als Matrix und ein Stück Doppelstrang zum Starten. Dieser Doppelstrang wird durch den M13-Primer gebildet, einem 17bp langen DNS-Abschnitt, der kurz vor der Linker-Sequenz an den Vektor bindet.

Der Reaktionsansatz enthält 5µl Einzelstrang-DNS, 1.5µl 10xKlenow-Puffer, 1µl M13 Primer (1.2ng/µl) und 2.5µl H<sub>2</sub>O und wird für 2Std. bei 60°C inkubiert.

#### 4.1.2.10.7. Sequenzierreaktion

Zur DNS mit dem daran gebundenen Primer werden zunächst 15µl <sup>32</sup>S-dATP und 1U Klenow-Polymerase pipettiert. 2µl dieses Reaktionsansatzes (Je einer pro Nukleotid) werden mit je 2µl eines Nukleotidgemisches, bestehend aus einem Nukleotid und seinem Dideoxyanalog, gemixt.

dATP:ddATP = 4µM:50µM

dCTP:ddCTP = 4µM:25µM

dGTP:ddGTP = 4µM:50µM

cTTP:ddTTP = 4µM:250µM

Die nicht kompetitiven Nukleotide sind zu jeweils 80µM vertreten. Die Reaktion erfolgt bei RT für 20 Min., daran schließt sich eine Nachfolge-Reaktion für weitere 15 Min mit 2µl eines dNTP-Gemisches von 0.5mM an. Die Reaktion wird gestoppt durch Zugabe von 4µl Probenpuffer (20mM EDTA in deionisiertem Formamid, 0.03%(w/v) Bromphenolblau und Xylencyanol). Vor dem Auftrag auf das Gel werden die Proben für 3 Min. bei 95°C denaturiert.

#### 4.1.2.10.8. Sequenziergel

Die Auftrennung der Sequenzleransätze erfolgt auf denaturierenden Polyacrylamidgelen. Die Elektrophorese erfolgte auf 6%(w/v) Acrylamidgelen (7M Harnstoff, Acrylamid:Bisacrylamid = 30:1 in 1xTBE). Die Laufzeiten der Gele betragen 1-5 Stunden bei 30W. Silikonisierung einer Glasplatte und Silanisierung der anderen bewirkt das Adhärenzieren des Gels auf der silanisierten Fläche. Danach erfolgt eine Fixierung durch 15min. Einlegen in 10% Essigsäure. Nach gründlicher Spülung mit Wasser wird das Gel bei 60°C auf der Glasplatte getrocknet und für 1-2 Tage bei RT mit einem Röntgenfilm exponiert.

#### 4.1.2.11. Induktion und Reinigung von Fusionsproteinen

Manche Plasmide tragen ein Gen, dessen Expression bei niedrigen Wachstumstemperaturen des Wirtsbakteriums durch einen hitzelablen Repressor abgeschaltet ist. Bei potentem Promotor wird nach Temperaturerhöhung das Genprodukt in großen Mengen synthetisiert. Eine weitere Besonderheit der Plasmide besteht darin, daß sich am Ende eines solchen Gens, noch vor einem Transkriptions- oder Translationsstop, ein Polylinker befindet, in den fremde DNS-Abschnitte hineinkloniert werden können. Das Translationsprodukt eines solchen rekombinanten Gens ist ein sog. "Fusionsprotein", ein bakterielles Protein, an dessen C-Terminus ein anderes Protein angehängt ist. Auf diese Weise lassen sich auch eukaryontische Gene oder Genabschnitte in Bakterien exprimieren.

Der Hitzeschock erfolgt bei einer Übernacht-Kultur eines bei 28°C oder 30°C gewachsenen Bakterienstammes mit hitzelablen Repressor durch rasches Verdünnen der Kultur mit 4fachem Volumen Medium von 43°C. Es ist wichtig, daß die Temperaturerhöhung plötzlich erfolgt. 2-4 stündiges Schütteln bei 43°C ermöglicht eine verstärkte Translation des Fusionsproteins. Danach werden die Bakterien abzentrifugiert und das Sediment in 5ml Glukosepuffer (bei 500ml Ausgangskultur) suspendiert. Um die Bakterien aufzuschließen und die DNS zu zerkleinern wird die Suspension für einige Minuten mit Ultraschall behandelt (auf Eis). Nach 20 Min. Zentrifugation bei 20000rpm wird das Sediment in 1M Harnstoff suspendiert und wieder für einige Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach erneuter Zentrifugation für 20 Min. bei 20000rpm wird das Sediment mit 7M Harnstoff versetzt und mit Ultraschall behandelt. Wiederum wird 20 Min. lang bei 20000rpm zentrifugiert. In dem jetzt erhaltenen Überstand sollte sich das Fusionsprotein befinden. Vorsichtshalber sollten jedoch alle Überstände sowie das letzte Sediment aufgehoben werden und

auf den Gehalt an Fusionsprotein auf einem SDS-Polyacrylamidgel überprüft werden. Der Überstand, der das Fusionsprotein enthält, wird für 2 Tage gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und danach lyophilisiert. Die Proteinmengenbestimmung erfolgt durch Auswiegen des Lyophilisats. 100ml einer Übernachtskultur mit dem Gen für ein MS2-Polymerase-Fusionsprotein ergeben nach Hitzeinduktion ca. 40-50mg Lyophilisat, was bis zu 40% aus Fusionsprotein besteht.

Für weiteren Einsatz der Fusionsproteine im zellulären oder biochemischen Bereich kann man in PBS durch 5Min. Ultraschallbehandlung eine feine, sterile Suspension herstellen.

## 4.2. Biochemische Arbeiten

### 4.2.1. Material

#### 4.2.1.1. Abkürzungen

|              |                                                                            |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ Mig | anti Maus Immunglobulin                                                    |
| Ac           | Acetat                                                                     |
| Ak           | Antikörper                                                                 |
| APDS         | Ammoniumperoxodisulfat                                                     |
| $\beta$ Me   | $\beta$ -Merkaptoäthanol                                                   |
| EDTA         | Äthylendiamintetraessigsäure                                               |
| ELISA        | Enzyme Linked Immunosorbent Test, Enzymgekuppelter Anti-körperbindungstest |
| NP 40        | Nonidet P 40                                                               |
| PBS          | Phosphatgepufferte Saline                                                  |
| PEG          | Polyäthylenglykoll                                                         |
| PMSF         | Phenylmethylsulfonylfluorid                                                |
| PO           | Peroxidase                                                                 |
| PAGE         | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                            |
| SDS          | Laurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)                                         |
| Seph         | Sephrose                                                                   |
| SPA          | Staphylococcus aureus-Protein A                                            |
| TCA          | Trichloressigsäure                                                         |
| TEMED        | N,N,N',N'Tetramethyläthylendiamin                                          |

#### 4.2.1.2. Chemikalien

|                            |                        |
|----------------------------|------------------------|
| Ampholine                  | Pharmacia              |
| Amplify                    | Amersham, Braunschweig |
| Dianisidin                 | Sigma, München         |
| Dimethylsuberimidat        | Sigma, München         |
| Harnstoff f. IEF           | BRL, Gibco             |
| Indubiose A37              | Biollignes             |
| Kaninchen $\alpha$ Mig     | dakopatts, Hamburg     |
| Kan. $\alpha$ Mig-PO       | dianova, Hamburg       |
| Methionin- $^{35}$ S       | Amersham, Braunschweig |
| Methioninfreies MEM-Medium | Gibco, Karlsruhe       |
| Na-Nitroprussid            | Sigma, München         |

|                                   |                             |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Neuraminidase VIII                | Sigma, München              |
| Nitrocellulose                    | Schleicher & Schüll, Dassel |
| O-Phenylendiamin                  | Sigma, München              |
| PVC-ELISA-Platten                 | Falcon                      |
| SPA-Sephrose CL4B                 | Sigma, München              |
| Trasyol®                          | Bayer                       |
| Vorgefärbter Molekulargew.-Marker | BRL Gibco                   |

#### 4.2.1.3. Radiochemikalien

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| <sup>35</sup> S-Methionin | Amersham, Braunschweig |
|---------------------------|------------------------|

#### 4.2.1.4. Häufig verwendete Puffer

##### PBS (Phosphatgepufferte Saline) pH 7.2

|     |    |                                                      |
|-----|----|------------------------------------------------------|
| 150 | mM | NaCl                                                 |
| 3   | mM | KCl                                                  |
| 8   | mM | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·x2H <sub>2</sub> O |
| 2   | mM | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      |

#### 4.2.1.5. Verwendete monoklonale Maus-Antikörper

|       |                                                          |
|-------|----------------------------------------------------------|
| B1-8  | αNP; IgM (Reth 1979)                                     |
| HC10  | αHLA-B und C, schwere Ketten; IgG2a (Neeffes 1986)       |
| L243  | αHLA Kl.II, β-Kette von DR; IgG2a (Lampson 1980)         |
| S43   | αNP; IgG2a (Reth 1979)                                   |
| TM1   | αB27; IgG2b (Thurau 1987, in Vorber.)                    |
| TM2   | u.a.αB27; IgG2b (Thurau 1987, in Vorber.)                |
| TM3   | αHLA; IgG2b (Thurau 1987, in Vorber.)                    |
| TM4   | αB27*, B15; IgG2b (Thurau 1987, in Vorber.)              |
| TM5   | αB27, B5, B13, B35, B44; IgG2a (Thurau 1987, in Vorber.) |
| TM6   | αB27, B5; IgM (Thurau 1987, in Vorber.)                  |
| W6/32 | αHLA A und B; IgG2a (Parham 1979)                        |

## 4.2.2. Methoden

### 4.2.2.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine, durch SDS denaturiert und negativ geladen, auf einem Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Zusammensetzung eines 11% Gels:

|     |    |                                   |
|-----|----|-----------------------------------|
| 15  | ml | 30% Acrylamid / 0.8% Bisacrylamid |
| 15  | ml | demin.Wasser                      |
| 10  | ml | 1.5M Tris/HCl/0.4% SDS pH 8.8     |
| 200 | µl | APDS                              |
| 40  | µl | TEMED                             |

Das Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten bis ca 3-4 cm unter den oberen Rand der kleineren Glasplatte gegossen. Um das Austrocknen des oberen Gelrandes zu vermeiden, wird das Gel zum Polymerisieren mit Wasser überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wird das Wasser entfernt und das Sammelgel aufgegossen.

Sammelgel:

|     |    |                               |
|-----|----|-------------------------------|
| 1.0 | ml | Acrylamid                     |
| 2.5 | ml | 1.5M Tris/HCl/0.4% SDS pH 6.8 |
| 6.0 | ml | H <sub>2</sub> O              |
| 100 | µl | APDS                          |
| 20  | µl | TEMED                         |

Für die Auftragung der Proben werden im oberen Sammelgelbereich Taschen ausgespart. Die Proben werden mit Probenpuffer versetzt und aufgetragen.

Probenpuffer:

|                                          |    |                             |
|------------------------------------------|----|-----------------------------|
| 10                                       | %  | Glyzerin                    |
| 3                                        | %  | SDS,                        |
| 5                                        | %  | β-Me                        |
| 3.75                                     | ml | Tris-Puffer (vom Sammelgel) |
| auf 10ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen. |    |                             |

**Laufpuffer:**

|      |   |                  |
|------|---|------------------|
| 14.4 | g | Glyzin           |
| 3.0  | g | Tris             |
| 1.0  | g | SDS              |
| 1    | l | H <sub>2</sub> O |

Die Laufzeit beträgt bei 50V etwa 15 Stunden. Als Molekulargewichtsstandard wird vorgefärbter Marker aufgetragen, der kovalent mit einem blauen Farbstoff verbunden ist.

Nach der Elektrophorese wird das Gel entweder für den Western Blot weiterverarbeitet oder bei radioaktiv markierten Proteinen fixiert, getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert. Es kann auch in einer Färbelösung 30 Min. gefärbt und anschließend so lange entfärbt werden, bis nur noch die Proteinbanden blau gefärbt sind. Danach wird das Gel unter Vakuum auf einem Filterpapier getrocknet.

**Färbelösung:**

|     |   |                          |
|-----|---|--------------------------|
| 0.2 | % | Coomassie Brilliant Blue |
| 50  | % | Methanol                 |
| 7   | % | Essigsäure               |

**Entfärbelösung:**

|    |   |            |
|----|---|------------|
| 30 | % | Methanol   |
| 7  | % | Essigsäure |

#### 4.2.2.2. Kovalente Kupplung von Immunglobulinen an Protein A-Sepharose (Gersten 1978)

Um bestimmte Antigene aus einem Kulturüberstand oder einem Zell-Lysat zu präzipitieren, braucht man spezifische Antikörper oder ein Antiserum, die an eine feste Trägersubstanz wie z.B. Sepharosekügelchen gebunden sind.

Staphylococcus Protein A hat die Eigenschaft, bestimmte Immunglobulinklassen zu binden (Ey, 1978). Um auch Maus-monoklonale Antikörper fixieren zu können, die nicht unter diese Klassen fallen, läßt man zuerst ein polyklonales Kaninchen anti-Maus Serum mit der SPA-Sepharose reagieren (bei 4°C 1-12 Std. rollen). Der optimale pH für die Bindung von Ig G liegt bei 8. Nach mehrmaligem Waschen der Sepharose mit PBS wird der spezifische Maus-monoklonale Antikörper in einem Puffer mit pH 7 dazugegeben und wieder bei 4°C für einige Stunden gerollt. Nach dreimaligem Waschen mit 0.1M Boratpuffer pH8 wird der Antikörper-Protein A-Sepharose-Komplex miteinander kovalent verbunden.

Dazu werden 5mg/ml Dimethylsuberimidat in Boratpuffer frisch angesetzt und 200µl davon auf 100µl Sepharose gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei RT wird 3x mit PBS gewaschen. Um nicht-kovalent gebundenes Immunglobulin zu entfernen, wird für ein paar Minuten ein Azetat-Puffer pH 2.9 (0.15M NaCl, 0.1M Essigsäure) zugegeben. Anschließend wird die Sepharosematrix 3x mit PBS gewaschen. Die Sepharose kann in PBS/0.02% Na-Azid für mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

#### 4.2.2.3. Herstellung eines Zell-Lysates (Vasilov 1983)

Um ein Antigen aus der Zellmembran zu präzipitieren, muß die Zelle lysiert werden. Dafür werden Kulturzellen zunächst geerntet und 2x mit PBS gewaschen. Das trockene Pellet wird dann mit Lysepuffer versetzt.

Lysepuffer:

|       |    |                                   |
|-------|----|-----------------------------------|
| 10    | mM | Tris-HCl pH 6.8-7.5               |
| 1     | mM | MgCl <sub>2</sub>                 |
| 1     | mM | PMSF (Proteasenhemmer) in Athanol |
| 0.5-1 | %  | NP40                              |

Pro 10<sup>9</sup> Zellen nimmt man etwa 1ml Lysepuffer. Die Lyse findet für 1 Stunde auf Eis statt, danach werden Zellkerne und andere größere Zellreste 10 Min. lang bei 15000g abzentrifugiert. Im Überstand, der bei -70°C eingefroren werden kann, befinden sich die Membranantigene.

#### 4.2.2.4. Immunpräzipitation der Membranantigene

Das oben beschriebene Zell-Lysat wird zusammen mit der antikörpergekuppelten SPA-Sepharose für 2-4 Stunden oder über Nacht bei 4°C gerollt. Danach wird die Sepharose 3x entweder mit PBS oder mit NET gewaschen.

NET:

|     |    |                 |
|-----|----|-----------------|
| 150 | mM | NaCl            |
| 10  | mM | Tris/HCl pH 7.6 |
| 1   | mM | EDTA            |
| 0.5 | %  | NP40            |

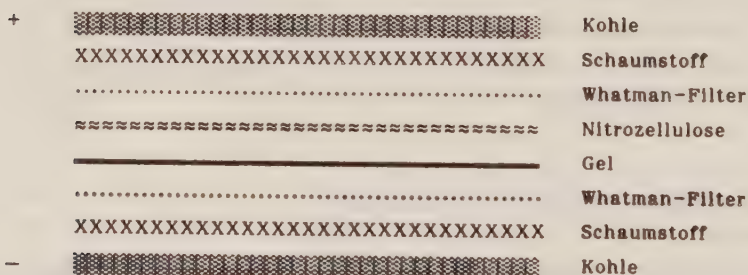
Eluiert wird das Antigen mit zweifachem Sepharosevolumen einer 50mM Desoxycholatlösung pH 11.2 (frisch ansetzen). Das Eluat wird sofort mit 1/10 Vol 0.5M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf pH 7.4 titriert. Die Sepharose wird mehrmals mit PBS nachgewaschen und kann für weitere Präzipitationen wiederverwendet werden. Das Eluat wird möglichst rasch mit Probenpuffer (mit oder ohne  $\beta\text{Me}$ ) versetzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### 4.2.2.5. Western Blot

(Towbin, 1979)

Im Gegensatz zum Southern- oder Northern-Blot, bei dem RNS bzw. DNS aus einem Gel auf Nitrozellulose als Trägermaterial übertragen wird, nennt man die Übertragung von Proteinen aus einer PAGE auf Nitrozellulose mit anschließenden Färbungen Western Blot. Dabei werden in einer horizontalen Versuchsanordnung unter elektrischer Spannung die Proteinbanden aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose überführt. Die Spannung liegt an zwei Kohleplatten an, zwischen denen puffergetränkte Schaumstoffplatten und puffergetränktes Whatman-Filterpapier für einen gleichmäßigen Stromfluß von 1A während 1-2 Stunden sorgen.

Versuchsanordnung:



Blotting-Puffer:

|     |    |                  |
|-----|----|------------------|
| 7.2 | g  | Glyzin           |
| 1.5 | g  | Tris             |
| 200 | ml | Methanol         |
| 800 | ml | H <sub>2</sub> O |

Es ist darauf zu achten, daß die einzelnen Schichten aus Filterpapier, Gel und Nitrozellulose luftblasenfrei übereinander liegen, um eine einwandfreie Übertragung der Proteine zu gewährleisten. Ferner sollte man vorher die Austragsbereiche der Proben am Gel auf der Nitrozellulose markieren.

Nach dem Blot-Vorgang wird die Nitrozellulose für 30 Min. in PBS/ 0.05% Tween/0.1% Gelatine gelegt, um unspezifische Proteinbindung zu blockieren. Die Nitrozellulose kann für eine Reaktion mit mehreren verschiedenen Antikörpern mit einem Skalpell in Streifen geschnitten werden. Danach erfolgt eine einstündige Inkubation in einer Lösung des Antikörpers oder -serums, der das nachzuweisende Protein spezifisch erkennt. Nach 10 Min. Waschen in PBS/Tween wird die Nitrozellulose für eine weitere Stunde in eine Lösung eines peroxydasegekuppelten Antikörpers, der den ersten Antikörper bindet, inkubiert. Der hier verwendete Kaninchen  $\alpha$ Mig-PO-Antikörper (dianova) wird dafür 1:2500 in PBS/Tween verdünnt. Anschließend wird die Nitrozellulose 3x10 Min. in PBS/Tween gewaschen und in eine Substratlösung für Peroxydase (100mg Na-Nitroprussid, 40mg Dianisidin und 20 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50ml H<sub>2</sub>O) gelegt. Das farblose Substrat wird von der Peroxydase zu einem grünen Produkt gespalten. Nach wenigen Sekunden bis Minuten beginnt sich die Nitrozellulose an den Stellen, an denen der Antikörper mit der Antigenbande reagiert hat, durch Farbstoff-Niederschlag anzufärben. Die Farbreaktion wird durch Abspülen mit Wasser gestoppt. Die Blotstreifen werden getrocknet aufbewahrt.

#### 4.2.2.6. Radioimmunpräzipitation

(Vasilov 1982)

Bei der Radioimmunpräzipitation werden biosynthetisch radioaktiv markierte Zellbestandteile mit spezifischen Antikörpern isoliert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit einem Röntgenfilm exponiert.

Die Voraussetzung für eine gute biosynthetische Markierung ist eine stoffwechselaktive Zelle. Die Kultur wird zunächst in methioninfreiem Medium (MEM ohne Methionin) mit 5% fetalem Kälberserum für 1 Std. bei 37°C gehalten, um noch in der Zelle vorhandenes Methionin aufzubauchen. Zur Markierung werden pro 1-5x10<sup>6</sup> Zellen 75-100 $\mu$ Cl <sup>35</sup>S-Methionin zur Kultur gegeben und für mind. 6 Std. bis über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen wie unter 4.3.3. beschrieben lysiert. Vor der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper wird das Zell-Lysat über SPA-Sepharose vorgereinigt, um unspezifisch bindende Substanzen zu absorbieren. Die Antikörper werden für die Präzipitation so vorbereitet, wie unter 4.3.2. beschrieben, es ist allerdings nicht unbedingt erforderlich, die Antikörper kovalent an die Protein A-Sepharose zu koppeln. Die Elution des markierten Antigens von der Sepharose erfolgt durch 3 Min. Kochen in

SDS-Probenpuffer. Nach der Elektrophorese wird das Gel zunächst für 30 Min. in Fixierlösung (30% Methanol, 1% Essigsäure und 1% TCA) geschüttelt. Danach wird es für 20-30 Min. in Amplify gelegt, wodurch die schwache Strahlung von  $^{32}\text{S}$  für die Exposition mit dem Röntgenfilm verstärkt wird. Nach dem Trocknen auf Filterpapier wird das Gel, je nach Intensität der Markierung, für einige Stunden bis Tage exponiert.

#### 4.2.2.7. Isoelektrische Fokussierung (Neeffes 1986)

Bei der Isoelektrischen Fokussierung werden Proteine nur nach ihrer Ladung aufgetrennt. Bei gleichem Molekulargewicht legen z.B. verschiedene MHC-Antigene in einem kontinuierlichen pH-Gradienten bei der Fokussierung unterschiedliche Wegstrecken zurück. Wie unter 4.3.6. beschrieben, werden radioaktiv markierte Antigene mittels antikörpergekuppelter SPA-Sepharose isoliert.

Zur Markierung werden je  $1.5 \times 10^6$  Zellen in 1.5ml methioninfreiem Medium in ein Loch einer 24well Costarplatte gegeben. Nach 1 Std. "Aushungern" werden pro Kultur  $2\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin (ca  $25\mu\text{Ci}$ ) zugefügt und für 6 Std markiert. Die Zellen werden dann 2x mit PBS gewaschen und in 1ml (pro  $10^7$  Zellen) Lysepuffer 1 Std. auf Eis gestellt. Nach anschließendem Abzentrifugieren wird der Überstand zur Voradsorption für mind. 4 Std. mit Kaninchen  $\alpha$  Mlg-SPA-Seph und SPA-Seph gerollt. Der Überstand wird dann zu  $50\mu\text{l}$  antikörpergekuppelter Sepharose gegeben und für 1 Std. bei  $4^\circ\text{C}$  gerollt. Die Sepharose wird danach je 2x mit den Waschpuffern A, B und C gewaschen.

Lysepuffer:

|    |               |                                 |
|----|---------------|---------------------------------|
| 1  | %             | Taurocholat in PBS              |
| 10 | $\mu\text{l}$ | 100mM Benzamidin-HCl in Äthanol |
| 10 | $\mu\text{l}$ | 200mM PMSF in Äthanol           |
| 20 | $\mu\text{l}$ | Trasylo! <sup>®</sup>           |

Waschpuffer A:

|      |    |                 |
|------|----|-----------------|
| 0.05 | M  | Tris/HCl pH 8.2 |
| 1    | mM | EDTA            |
| 0.5  | M  | NaCl            |
| 0.5  | %  | Taurocholat     |

**Waschpuffer B:**

|      |   |                 |
|------|---|-----------------|
| 0.05 | M | Tris/HCl pH 8.2 |
| 0.15 | M | NaCl            |
| 0.5  | % | Taurocholat     |
| 0.1  | % | SDS             |

**Waschpuffer C:**

|      |   |                 |
|------|---|-----------------|
| 0.05 | M | Tris/HCl pH 8.2 |
| 0.15 | M | NaCl            |
| 0.5  | % | Taurocholat     |

Danach wird zur Sepharose, an die das gesuchte Antigen noch gebunden ist, mit 50µl Neuraminidase Typ VIII in 20µl Reaktionspuffer (50mM NaAc pH 5.0, 1mM CaCl<sub>2</sub>) gegeben und 4 Std. bei 37°C geschüttelt. Nach Abschluß der Reaktion wird die Sepharose 2x mit Puffer C gewaschen. Zur Elution des Antigens fügt man 15µl IEF-Probenpuffer hinzu, zentrifugiert ab und trägt die Probe auf das Gel auf.

**Probenpuffer: 9.5 M Harnstoff**

|     |   |                          |
|-----|---|--------------------------|
| 1.6 | % | Ampholine 5-7            |
| 0.4 | % | Ampholine 3.5-10         |
| 5   | % | β-Me                     |
| 2   | % | NP40 in H <sub>2</sub> O |

Für ein IEF-Gel von 0.75mm Dicke benötigt man:

|       |    |                              |
|-------|----|------------------------------|
| 13.75 | g  | Harnstoff (BRL)              |
| 7.5   | ml | Acrylamid/Bisacr. (30%/1.6%) |
| 10.0  | ml | 10%NP40                      |
| 11.0  | ml | H <sub>2</sub> O             |
| 2.0   | ml | Ampholine 5-7                |
| 0.5   | ml | Ampholine 3.5-10             |
| 0.2   | ml | Ampholine 7-9                |
| 50.0  | µl | TEMED                        |
| 100.0 | µl | 10 % APDS                    |

Der Harnstoff wird im Wasserbad bei ca 50°C bis zur vollständigen Auflösung erwärmt, erst nach dem Abkühlen auf RT werden die Ampholine zugegeben. Das Gel wird ohne Sammelgel gegossen. Nach ca. 45Min. Polymerisation wird das Gel in eine Gelkammer gestellt, deren unteres Pufferreservoir mit 0.01M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gefüllt ist. Nun werden die Zwischenräume zwischen Gel und Gelkammer mit Agarose abgedichtet, um eine Pufferbrücke zwischen oberem und unterem Pufferreservoir zu vermeiden. Da-

nach wird das an der Sepharose gebundene Antigen mit 20µl Probenpuffer eluiert, auf das Gel aufgetragen und mit Probenpuffer, der 1:1 mit Wasser verdünnt ist und außerdem Bromphenolblau enthält, überschichtet. Dann erst wird das obere Pufferreservoir vorsichtig mit 0.02M entlüfteter NaOH gefüllt. Das Gel soll 12-16 Std. bei maximaler Spannung von 1000V laufen, wobei die Stromstärke auf eine Anfangsspannung von 400V eingestellt wird.

Nach der Fokussierung wird das Gel für 30 Min. in 30% Methanol/1% TCA/1% Essigsäure fixiert und 30 Min. in Amplify gelegt. Nach anschließendem Trocknen wird das Gel 2-3 Tage mit einem Röntgenfilm exponiert.

#### 4.2.2.8. Ouchterlony-Immundiffusion (Ouchterlony, 1970)

##### Isotypbestimmung bei monoklonalen Antikörpern

Die Immundiffusion ist eine nach den Gesetzen der Diffusion erfolgende Verteilung von löslichem Antigen und löslichem Antikörper, die bei korrespondierenden Reaktionspartnern in der Konfrontationszone zur Präzipitatbildung durch Antigen-Antikörperkomplexe führen. Bei der Methode nach Ouchterlony wird eine radiale Diffusion beider Reaktionspartner auf Agaroseplatten durchgeführt. In unserem Fall fungiert der Maus-monoklonale Antikörper als Antigen für Isotypspezifische Kaninchen-Antiseren.

Für die Agaroseplatten wird 1g Agarose (Indubiose A37) mit 3g PEG 6000 und 500µl 25% Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-Lösung mit 100ml 0.2M Phosphatpuffer pH 7.5 mit 0.186g EDTA versetzt, durch Erhitzen gelöst und bis zu 3mm Höhe in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren werden in radialer Form Löcher aus der Agarose gestanzt.

Schema:



Bei mehreren zu testenden Isotypen gibt man die Kaninchenserum ins mittlere Loch und die monoklonalen Antikörper (Kulturüberstände 10fach konzentrieren) in die umgebenden Löcher, bei nur einem Testantikörper umgekehrt. Die Petrischalen werden dann luftdicht verschlossen, und für einen bis mehrere Tage in den Kühlschrank gestellt. Bei positiver Reaktion des Antikörpers mit einem Antiserum sieht man zwischen den jeweiligen Auftragslöchern eine Präzipitinlinie. Zur Kontrolle der Kaninchenserum sollte ein polyklonales Maus-Serum mit verschiedenen Isotypen aufgetragen werden.

#### 4.2.2.9. ELISA: Enzymgekuppelter Immunosorbent-Test (Engvall 1971)

Antigen-Antikörperreaktionen lassen sich mit hoher Sensitivität und Spezifität dann durchführen, wenn einer der beiden Reaktionspartner an einer soliden Matrix fixiert ist. Hierfür bieten sich PVC-Platten an, die die Eigenschaft besitzen, Proteine unspezifisch zu binden. Ein Proteinantigen wird also an der PVC-Platte fixiert, daran kann ein spezifischer Antikörper binden, der entweder direkt markiert ist oder wiederum von einem zweiten, markierten Antikörper erkannt wird. Die Markierung besteht hier aus einem Enzym, das ein farbloses Substrat zu einem farbigen Produkt umwandeln kann.

Die Vertiefungen der PVC-Platten werden mit 50-100µl einer Lösung von 5-10µg Proteinantigen/ml PBS beschickt und über Nacht bei 4°C inkubiert. (Fusionsproteine binden besser an die Platten, wenn man sie erst in 7M Harnstoff löst und dann mit PBS auf die gewünschte Proteinkonzentration bringt.) Dann wird die Platte ausgeschlagen und zur Blockierung noch freier Proteinbindungsstellen mit PBS/3%FCS gefüllt. Nach 1-3 Std. Inkubation bei 37°C oder 4°C über Nacht wird die Platte durch Untertauchen in PBS und anschließendem Ausschlagen 3x gewaschen. Nun werden 30-100µl des ersten, an das Antigen bindenden Antikörpers in die Vertiefungen pipettiert und bei 4°C über Nacht oder 1-2 Std. bei 37°C inkubiert. Nach 3x Waschen wird der PO-gekuppelte Kaninchen  $\alpha$  Maus-Ig-Antikörper (dianova) (1:5000 Verd. in PBS/3%FCS) für 1-2 Std. bei 37°C oder 4°C ü.N. zugegeben. Vor Zugabe des Substrates muß wieder 3x mit PBS gewaschen werden. Das Substrat (O-Phenylendiamin) wird kurz vor Gebrauch in einer Konzentration von 1mg/ml in Substratpuffer (35ml 0.1M Zitronensäure und 65ml 0.1M Na-Zitrat) mit 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst und in die Platten gegeben. Die (lichtempfindliche!) Peroxydase hydrolysiert das Substrat zu einem gelben Farbstoff, dessen Konzentration bei 450nm gemessen werden kann. Die Farbstoffkonzentration steht in direktem Verhältnis zur Menge des gebundenen Enzym-Antikörperkomplexes und läßt somit eine Aussage über die Menge des an das Antigen gebundenen ersten Antikörpers zu.

### 4.3. Zelluläre Arbeiten

Die Arbeiten für Langzeitkulturen (Kulturdauer > 1Tag) werden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Geräten und sterilen Medien durchgeführt. Die Medien werden, wenn nicht anders angegeben, auf 37°C oder zumindest RT vorgewärmt zu den Zellen gegeben. Pulvermedien werden mit autoklaviertem, zweifach destilliertem Wasser hergestellt.

#### 4.3.1. Material

##### 4.3.1.1. Abkürzungen

|            |                                                          |
|------------|----------------------------------------------------------|
| A          | Aminopterin                                              |
| AMLC       | Autologe Monozyten-Lymphozyten-Kultur                    |
| APC        | Antigen presenting cells, Antigen präsentierende Zellen  |
| Arg        | Arginin                                                  |
| $\beta$ Me | $\beta$ Mercaptoäthanol                                  |
| B.pert.    | Bordetella pertussis                                     |
| CML        | Cell Mediated Lysis, Zellvermittelter Zytotoxizitätstest |
| DMSO       | Dimethylsulfoxyd                                         |
| EBV        | Epstein Barr Virus                                       |
| EPICS      | Electronical Programmable Individual Cell Sorter         |
| FCS        | Fetales Kälberserum                                      |
| FITC       | Fluoreszein-Isocyanat                                    |
| LCL        | Lymphoblastoide Zelllinie                                |
| L-Glu      | L-Glutamin                                               |
| H          | Hypoxanthin                                              |
| HS         | Humanserum                                               |
| Ig         | Immunglobulin                                            |
| i.p.       | Intraperitoneal                                          |
| i.v.       | Intravenös                                               |
| NP         | 4-hydroxy-3-nitro-phenylacetyl                           |
| PBS        | Phosphatgepufferte Saline                                |
| PEG        | Polyäthylenglycoll                                       |
| PHA        | Phyto-Haemagglutinin                                     |
| PLT        | Primed Lymphocyte Test, Stimulationstest für T-Zellen    |
| T          | Thymidin                                                 |

## 4.3.1.2. Material und Geräte

|                              |                                             |
|------------------------------|---------------------------------------------|
| Aminopterin                  | Sigma, München                              |
| B.pertussis                  | Behring, Marburg                            |
| Clex                         | Interchem, München                          |
| DMSO                         | Sigma, München                              |
| EPICS                        | Coulter                                     |
| FCS                          | Sebio, Walchelsing und Boehringer, Mannheim |
| Ficoll 400                   | Serva, Heidelberg                           |
| Gammacell 40                 | Atomic Energy of Canada Ltd.                |
| Gewebekultur-Plastikmaterial | Costar, Fernwald                            |
| L-Glutamin                   | Serva, Heidelberg                           |
| Hypoxanthin                  | Sigma, München                              |
| nicht essentielle Aminos.    | Gibco, Karlsruhe                            |
| PEG 4000                     | Serva, Heidelberg                           |
| Penicillin                   | Sebio, Walchelsing                          |
| PHA M                        | Difco Lab., Detroit                         |
| Pyruvat                      | Serva, Heidelberg                           |
| Sterilfilter                 | Schleicher & Schüll, Dassel und Nalgene     |
| RPMI-Medium                  | Gibco, Karlsruhe                            |
| Streptomycin                 | Sebio, Walchelsing                          |
| Szintillationsflüssigkeit    | Roth, Karlsruhe                             |
| Thymidin                     | Sigma, München                              |
| Urovison                     | Behring, Marburg                            |
| Zlege $\alpha$ Mauslg-FITC   | dianova, Hamburg                            |

## 4.3.1.3. Radiochemikalien

|                                  |               |
|----------------------------------|---------------|
| $^{51}\text{Cr}$ -Natriumchromat | NEN, Dreieich |
| $^3\text{H}$ -Thymidin           | NEN, Dreieich |

## 4.3.1.4. Zelllinien

|         |                                                                                          |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| B27.1   | B27-exprimierende P815-Linie, TK <sup>+</sup> (Kuon 1987)                                |
| Daudi   | Humane EBV-transformierte B-Zelllinie<br>Oberflächen-HLA K1.1 <sup>-</sup> (Ploegh 1979) |
| LCL DJS | Humane EBV-transf. B-Zelllinie,<br>Geschenk von Fr.Prof.Dr. Schendel                     |

|                       |                                                                                       |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| LCL GW                | Humane EBV-transf. B-Zelllinie, selbst etabliert                                      |
| LCL KR 3598           | Humane EBV-transf. B-Zelllinie<br>Geschenk von Fr.Dr.Müller, Tübingen                 |
| LCL MaLa              | Humane EBV-transf. B-Zelllinie, selbst etabliert                                      |
| LCL ML 6868           | Humane EBV-transf. B-Zelllinie<br>Geschenk von Fr.Dr.Müller, Tübingen                 |
| LCL MuWa              | Humane EBV-transf. B-Zelllinie<br>Geschenk von Hr.Dr.Wank                             |
| LCL ST                | Humane EBV-transf. B-Zelllinie<br>Geschenk von Fr.Prof.Dr.Schendel                    |
| LG2                   | Humane EBV-transformierte B-Zelllinie<br>(Gatti 1976)                                 |
| P815                  | Maus-Mastozytom, TK <sup>-</sup> (Van Pel 1985)                                       |
| P815/B27 <sup>+</sup> | Maus-Mastozytom mit B27-Antigen (Kuon, 1987)                                          |
| X63 Ag8.653           | Maus-Myelom, HGPRT <sup>-</sup> , TK <sup>-</sup> , Ig <sup>-</sup><br>(Kearney 1979) |

Die bei 2.2.5. getesteten B-LCL AnSch und BG waren selbst etabliert, die Linien EsWa, MuCa, KaLea, BriWa, CorWa, VaCa und VaJä waren Geschenke von Frau Dr. Johnson.

#### 4.3.1.4.1. HLA-Typisierungen der verwendeten Linien und PBL

|             |                                                  |
|-------------|--------------------------------------------------|
| LCL DJS     | A2, A3, B35, B37, Cw4, DR1, DR2, DQw1            |
| LCL GW      | A2, A3, B13, B44, Cw6, DR1, DR4, DQw1, DQw3      |
| LCL KR 3598 | A2, B44, Cw5, DR5,                               |
| LCL LG2     | A2, B27, Cw1, DR1                                |
| LCL MaLa    | A2, A3, B7, B27, Cw3                             |
| LCL ML 6868 | A3, A24, B27, Cw2, DR1, DR2, DQw1                |
| LCL MuWa    | A2, A3, B27, B35                                 |
| LCL ST      | A1, A26, B8, B14, Cw7, Cw8, DR3, DR7, DQw2, DQw3 |
| PBL EL      | A2, B8, B27, Cw2, Cw7, DR3, DRw13(6), DQw1, DQw2 |
| PBL Has     | A2, A3, B27, B37, Cw1                            |
| PBL RK      | A2, B18, B60, Cw3, Cw8, DR4, DR5, DQw3           |
| PBL WM      | A2, B17, Bw51, Cw1, Cw6                          |

Alle Kulturen wurden im Brutschrank (Assab, Hannover oder Heraeus, München) bei 37°C, 80-90% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> gehalten.

#### 4.3.1.5. Häufig verwendete Medien

##### Zellkulturmedium

RPMI 1640  
 2 mM L-Glutamin  
 100 E/ml Penicillin  
 100 E/ml Streptomycin  
 1 mM Pyruvat  
 1/100 verd.nicht essentielle Aminosäuren  
 0.6 mg/ml Arginin  
 10% Serum

##### Einfriermedium für Zellen (eiskalt verwenden)

Kulturmedium wie oben beschrieben  
 mind. 10% Serum  
 10% DMSO

##### Ficoll 400, Dichte 1.077

36.98 g Ficoll 400 ad 477.5ml H<sub>2</sub>O  
 100 ml Urovison  
 steril filtrieren oder autoklavieren

#### 4.3.1.6. Verwendete monoklonale Maus-Antikörper

|       |                                                                  |
|-------|------------------------------------------------------------------|
| B1-8  | $\alpha$ NP; IgM (Reth 1979)                                     |
| HC10  | $\alpha$ HLA-B und C, schwere Ketten; IgG2a (Neefjes 1986)       |
| L243  | $\alpha$ HLA K1.II, $\beta$ -Kette von DR; IgG2a (Lampson 1980)  |
| S43   | $\alpha$ NP; IgG2a (Reth 1979)                                   |
| TM1   | $\alpha$ B27; IgG2b (Thurau 1987, in Vorber.)                    |
| TM2   | u.a. $\alpha$ B27; IgG2b (Thurau 1987, in Vorber.)               |
| TM3   | $\alpha$ HLA; IgG2b (Thurau 1987, in Vorber.)                    |
| TM4   | $\alpha$ B27*, B15; IgG2b (Thurau 1987, in Vorber.)              |
| TM5   | $\alpha$ B27, B5, B13, B35, B44; IgG2a (Thurau 1987, in Vorber.) |
| TM6   | $\alpha$ B27, B5; IgM (Thurau 1987, in Vorber.)                  |
| W6/32 | $\alpha$ HLA A und B; IgG2a (Parham 1979)                        |

#### 4.3.2. Methoden

##### 4.3.2.1. Immunisierung der Mäuse

Fi(C57Bl/6 x BALB/c)-Mäuse im Alter von etwa 6 Wochen werden zweimal in wöchentlichem Abstand mit einem Gemisch von je 50µg der Fusionsproteine D1/2, D2 und D3 mit 10<sup>6</sup> inaktivierten Keimen von B.Pertussis in einem Volumen von 200µl i.p. immunisiert. Nach einer weiteren Woche erfolgt eine i.v. Injektion ohne Adjuvantien von wiederum je 50µg der oben aufgeführten FP. Drei Tage später wird die Milz entnommen und entweder gleich für die Fusion weiterverarbeitet oder eingefroren.

##### 4.3.2.2. Fusion der Maus-Milzzellen mit X63 Ag8.653

Medien:

HAT-Kulturmedium (Littlefield 1964)

RPMI 1640 wie beschrieben

2x10<sup>-8</sup>M βMe

1x HT

1x A

200x HT (pH 8-8.5 mit NaOH eingestellt)

272.2 mg Hypoxanthin

77.65 mg Thymidin

100 ml H<sub>2</sub>O

200x A (pH 8-8.5 mit NaOH eingestellt)

3.82 mg Aminopterin

100 ml H<sub>2</sub>O

PEG 4000

20g PEG autoklavieren. Solange das PEG noch flüssig ist, 28ml

RPMI/15% DMSO zugeben.

Zum Zeitpunkt der Fusion sollten sich die Myelomzellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die Mausmilz wird dem Tier sterilt entnommen und mit einem Spritzenstempel durch ein steriles Sieb in eine mit Medium gefüllte Petrischale gedrückt, wodurch eine mehr oder weniger gute Einzelzellsuspension ent-

steht. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren können verbleibende Zellklumpen zerkleinert werden. Milz- und Myelomzellen werden zusammen abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Zellsediment wird dann in ca 1ml (auf 37° vorge-wärmtem) PEG resuspendiert und nach 1 Min. mit 10ml warmem RPMI-Medium ohne HAT tropfenweise verdünnt. Danach werden die Zellen abzentrifugiert, um das PEG zu entfernen. das Zellsediment wird in HAT-Medium aufgenommen und in Flachbo-den-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verteilt. Die Zellkonzentration sollte etwa  $5 \times 10^5$  Zellen/ml betragen. Bei mycoplasmenfreien, gut wachsenden Myelomzellen und frischen Milzzellen ist die Zugabe von Füllzellen wie autologe Milzzellen oder Peritonealmakrophagen nicht notwendig. Sobald die ersten Hybridomklone sichtbar sind (nach 5-10 Tagen), wird die Kultur mit HT-Medium gefüttert. Frühestens drei Tage später kann Kulturüberstand zur Testung auf Antikörperproduktion abgenom-men werden.

#### 4.3.2.3. Klonierung

Um Monoklonalität der Zellen zu garantieren, werden die Zellen in einer Konzentra-tion von 0.3-0.5 Zellen/Flachboden-Mikrotiterwell ausgesät. Pro Kultur sollten  $5 \times 10^4$  Peritonealmakrophagen als Füllzellen zugefügt werden.

#### 4.3.2.4. Immunfluoreszenz

Fluoreszeinmarkierte Antikörper, die an Zelloberflächenantigene gebunden sind, lassen die Zelle bei UV-Anregung des Fluoreszeins grün leuchten. Die Sensitivität dieser Methode kann erhöht werden, wenn der auf die Zelle bindende Antikörper nicht direkt markiert ist, sondern noch mit einem zweiten, fluoreszeingekoppelten polyklonalen Antikörper komplexiert wird. Um Capping und Endozytose der Ober-flächenmoleküle zu vermeiden, wird der Färbevorgang auf Eis durchgeführt und auch nur mit eisgekühlten Medien gewaschen.

Die zu färbenden Zellen werden abzentrifugiert, das Pellet mit wenig PBS resus-pendiert und je 5 µl Zellsuspension (ca  $5 \times 10^4$ - $10^5$  Zellen) in Rundboden-Mikrowells geben. Dazu werden je 30 µl des ersten Antikörpers pipettiert und für 1 Std. auf Eis inkubiert. Gewaschen wird durch Zugabe von 100µl PBS, abzentrifugieren bei 1000rpm, Ausschlagen der Platte und vorsichtigem Aufschütteln des Pellets auf einem Schüttler (Vortex). Der Vorgang wird noch einmal wiederholt, bevor 30µl fluoreszenzmarkierter Antikörper (dianova, 1:40 verdünnt in PBS/3%FCS) zugegeben und 1 Std. im Dunkeln inkubiert wird. Dann wird dreimal gewaschen, das letzte Sediment mit ca 10µl PBS/FCS suspendiert, auf Objektträger aufgetragen und mit

einem Deckglas abgedeckt. Die Präparate sollten bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop kalt und dunkel aufbewahrt werden. Für die Analyse am EPICS werden die gefärbten Zellen in 100µl 1% Paraformaldehyd in PBS (filtriert) aufgenommen.

#### 4.3.2.5. Gewinnung von Humanseren

Frisch entnommenes Blut wird durch 15 Min. sofortigen Schüttelns mit sterilen Glasperlen defibriniert, danach mit 800g abzentrifugiert. Das entstehende Sediment aus Blutzellen kann, ebenso wie das beim Defibrinieren entstandene Gerinnsel, weiterverarbeitet werden (s. 4.3.2.6. und 4.3.2.9.). Das Serum wird abgenommen, durch ein Sterilfilter mit 0.45µm Porengröße filtriert, um verbliebene Zellen zu entfernen und Komplement-Faktoren für 30 Min. bei 56°C inaktiviert. Für einen Humanserumansatz werden Seren von mind. 8 verschiedenen Spendern gemischt.

#### 4.3.2.6. Präparation lymphoider Zellen

Das Zellsediment defibrinierten Spenderblutes wird mit PBS auf doppeltes Ausgangsvolumen gebracht, mit Ficoll unterschichtet und 25 Min. bei 800g zentrifugiert. Die dabei entstehende Interphase, die die erwünschten lymphoiden Zellen enthält, wird abgenommen und 3x mit PBS oder RPMI gewaschen.

#### 4.3.2.7. Herstellung von PHA-Blasten

Separierte Lymphozyten werden in RPMI-Medium mit 10% FCS oder HS, welches 1% PHA enthält, für 3-4 Tage in Kultur genommen. PHA stimuliert T-Lymphozyten, welche wiederum Wachstumsfaktoren produzieren, von denen auch B-Zellen stimuliert werden. PHA fördert Wachstum und Differenzierung von Lymphozyten durch polyklonale Stimulation.

#### 4.3.2.8. Etablierung EBV-transformierter B-Zelllinien

$5 \times 10^6$  Lymphozyten werden in 7ml RPMI-Medium mit 10% FCS aufgenommen, dem 1% PHA und 3ml B95-Überstand zugesetzt wird. Den B95-Überstand produziert eine Marmosetten-Linie, die mit EBV transformiert ist und aktives Virus in den Kulturüberstand ausscheidet. Die Kultur wird nach Bedarf mit RPMI-Medium/10% FCS

gefüttert. Wenn sich nach 3 Wochen noch Wachstum zeigt, kann man von einer etablierten EBV-transformierten B-Zelllinie ausgehen, die allerdings in den ersten 6-8 Wochen noch T-Zellen enthalten kann.

#### 4.3.2.9. Isolation von APC aus Blutgerinnsel

Die durch Defibrinierung entstandenen Blutgerinnsel werden in kleine Erlenmeyerkolben überführt und mit RPMI-Medium, das 16% autologes, d.h. vom gleichen Spender stammendes Serum enthält, über Nacht im Brutschrank inkubiert, wobei Zellen, hauptsächlich Monozyten, aus dem Blutgerinnsel auswandern. Am nächsten Tag wird die Zellsuspension mit Ficoll unterschichtet und 25 Min. lang bei 800g zentrifugiert. Die Zellen der Interphase werden 3x mit RPMI gewaschen und weiterverarbeitet.

#### 4.3.2.10. Präsentation von Fusionsproteinen

Fusionsproteine werden, wie bereits beschrieben, in PBS oder RPMI mit Ultraschall suspendiert. Sie werden in einer Konzentration von 10mg/ml angesetzt. Die antigenpräsentierenden Zellen (entweder EBV-transformierte B-Zelllinien oder aus Gerinnsel gewonnene Monozyten) werden pro  $10^6$  Zellen mit 500µg-1mg Fusionsprotein über Nacht oder mind. 6 Std. im Brutschrank kultiviert. Vor dem Einsatz als APC werden Reste der FP auf einem Ficoll-Gradienten entfernt. Vor der Verwendung als T-Zell-Stimulatoren werden B-Zelllinien mit 5000rad, Monozyten mit 2000rad bestrahlt, um unerwünschte Proliferation zu vermeiden.

#### 4.3.2.11. Gemischte Lymphozyten-Kultur (MLC) (Schendel, 1978)

##### Autologe Monozyten-Lymphozyten-Kultur (AMLC)

$5 \times 10^6$  Effektorzellen werden mit  $5 \times 10^6$  bestrahlten (2000rad) Stimulatorzellen oder  $1 \times 10^6$  autologen APC (s.4.3.2.10.) in 7ml RPMI/ 10%HS in einer kleinen Kulturflasche aufrecht stehend kultiviert. Nach 6 Tagen werden die Zellen geerntet und die Zytotoxizität auf  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Zielzellen getestet. Für die Stimulation zur IL-2-Produktion werden je  $1 \times 10^6$  Effektorzellen mit  $2 \times 10^6$  Stimulatorzellen oder APC in 1ml Medium in 24-well-Costarplatten gesetzt. Nach 6, 12, 18, 24, 48 und 72 Stunden wird Kulturüberstand abgenommen, der auf seinen IL2-Gehalt als Maß für die Stimulation von Helferzell-Populationen getestet wird.

#### 4.3.2.12. Markierung von Zellen mit $^{51}\text{Cr}$

EBV-transformierte B-Zelllinien (B-LCL) oder PHA-Blasten werden als Zielzellen im  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest eingesetzt. Zu diesem Zweck werden 3-4 Tage alte PHA-Blasten oder B-LCL in möglichst logarithmischer Wachstumsphase in einem konischen 15ml-Röhrchen abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf ca. 100 $\mu\text{l}$  verworfen und das Zellsediment im Restmedium suspendiert. Nach Zugabe von 50-100 $\mu\text{l}$   $^{51}\text{Cr}$ -Natriumchromat (1:3 verdünnt in RPMI) werden die Zellen bei leicht geöffnetem Deckel für 2 Std. im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in RPMI wird die Zellzahl bestimmt und die Zellen als Zielzellen im Zytotoxizitätstest eingesetzt.

#### 4.3.2.13. Der Zellvermittelte Cytotoxizitätstest (CML)

Der CML-Test wird in Rundboden-Mikrotiterplatten von Costar durchgeführt. Dabei werden je 100 $\mu\text{l}$  mit  $^{51}\text{Cr}$  markierte Zielzellen mit 100 $\mu\text{l}$  Effektorzellen 4 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Bei konstanter Zahl der Zielzellen ( $4 \times 10^4/\text{ml}$ ) wird die Zahl der Effektoren variiert. Von jedem Effektor:Zielzellen-Verhältnis werden Triplikate erstellt. Die spontane Lyse der Zielzellen wird ermittelt, indem 100 $\mu\text{l}$   $^{51}\text{Cr}$  markierte Zielzellen mit 100 $\mu\text{l}$  Medium inkubiert werden, zur Ermittlung der maximal freisetzbaren Radioaktivität werden die Zielzellen mit der von ihnen aufgenommenen Radioaktivität direkt gemessen. Nach Ende der Inkubationszeit werden aus dem Gesamtvolumen von 200 $\mu\text{l}$  aus jedem Mikroloch 100 $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen. Der Prozentsatz an spezifischer Lyse der Targetzellen wird gemessen (Mittelwert der Triplikate), indem man die Menge an freigesetztem Chrom im Überstand nach folgender Formel bestimmt:

$$\% \text{ spez. Lyse} = \frac{\text{exp. } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane Lyse}}{\text{max. } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane Lyse}} \times 100$$

#### 4.3.2.14. IL-2 Prolifertationstest und $^3\text{H}$ -Thymidinmarkierung

Zum Nachweis der IL-2-Freisetzung durch stimulierte T-Helfer-Zellen werden Überstände der MLC und AMLC zu IL-2-abhängigen Zellen gegeben, deren IL-2-bedingte Proliferation durch Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in die DNS gemessen wird

In Rundboden-Mikrotiterplatten von Costar werden pro Loch  $2 \times 10^4$  IL-2-abhängige Zellen (ein Geschenk von Fr. Dr. Schendel) in 50  $\mu$ l RPMI/10%HS zu 50  $\mu$ l MLC/AMLC-Überstand gegeben. Als Kontrollen werden nur Medium, rekombinantes IL-2 und PHA zugegeben. Nach 64 Std. Inkubation werden pro Loch 15  $\mu$ l (entspricht 2  $\mu$ Cl)  $^3$ H-Thymidin hinzugefügt und für weitere 8 Std. inkubiert. Danach werden die Platten entweder bei 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt oder die Zellen unmittelbar geerntet.

#### 4.3.2.15. Ernten der Zellen und Messen der eingebauten Radioaktivität

Die Zellen werden in einen Skatron Cell Harvester durch Aqua dest. lysiert und die radioaktiv markierte DNS auf Filterpapier gefällt. Nach mindestens 30 Min. Trocknen bei 60°C können die Filterplättchen ausgestanzt und in Zählröhrchen transferiert werden. Pro Röhrchen wird etwa 1ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Die Zählung als cpm erfolgt in einem  $\beta$ -Counter der Fa. Packard.

## LITERATURVERZEICHNIS

- ADA,G. and Skehel,J.J.: Are peptides good antigens? *Nature* 316, 764-765, (1985)
- AMOR,M., Tosi,M., Duponchel,C., Steinmetz,M. and Meot,T.: Liver mRNA probes disclose two cytochrome P-450 genes duplicated in tandem with the complement C4 loci of the mouse H-2S region, *PNAS* 82, 4453-4457 (1985)
- ARNOLD,B., Burgert,H.-G., Hamann,U., Hämmerling,G.J., Kees,U. and Kvist,S.: Functional studies on genetically engineered H2-antigens: Cytolytic T-cells recognize the two N-terminal domains of H2-antigens in tandem in influenza infected cells, *Cell* 38, 79-87 (1984)
- ARNOLD,B., Horstmann,U., Kuon,W., Burgert,H.-G., Hämmerling,G.J. and Kvist,S.: Alloreactive cytotoxic T-cells preferentially recognize conformational determinants on histocompatibility antigens: Analysis with genetically engineered hybrid antigens, *PNAS* 82, 7030-7034 (1985)
- ASHWELL,J.D. and Schwartz,R.H.: T-cell recognition of antigen and the Ia molecule as a ternary complex, *Nature* 320, 176-179 (1986)
- BABBITT,B.P., Allen,P.M., Matsueda,G., Haber,E. and Unanue,E.R.: Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules, *Nature* 317, 356-361 (1985)
- BEVAN,M.: Class discrimination in the world of immunology, *Nature* 326, 192-194 (1987)
- BLACKMAN,M., Yagüe,J., Kubo,R., Gay,D., Coleclough,C., Palmer,E., Kappler,J. and Marrack,P.: The T cell repertoire may be biased in favour of MHC recognition, *Cell* 47, 349-357 (1986)
- BLANDEN,R.V. and Ada,G.L.: A dual recognition model for cytotoxic T cells based on thymic selection of precursors with low affinity for self H-2 antigens., *Scand. J. Immunol.* 7, 181-190 (1978)
- COHEN,G.H., Dietzschold,B., Ponce de Leon,M., Long,D., Golub,E., Varrichio,A., Pereira,L. and Eisenberg,R.J.: Localization and synthesis of an antigenic determinant of Herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody, *Journal of Virology* 49, 102-108 (1984)

COLIGAN, J.E., Kindt, T.J., Uehara, H., Martinko, J. and Nathenson, S.G.: Primary structure of a murine transplantation antigen., *Nature* 291, 35-39 (1981)

DEMBIC, Z., von Boehmer, H. & Steinmetz, M.: The role of T-cell receptor  $\alpha$  and  $\beta$  genes in MHC-restricted antigen recognition, *Immunol. Today* 7, 308-311 (1986)

DEMBIC, Z., Haas, W., Weiss, S., McCubrey, J., Klefer, H., Von Boehmer, H. and Steinmetz, M.: Transfer of specificity by murine  $\alpha$  and  $\beta$  T-cell receptor genes, *Nature* 320, 232-238 (1986)

DROUIN, J.: Cloning of human mitochondrial DNA in *Escherichia coli*., *J.Mol.Biol.* 140, 15-34 (1980)

ENGVALL, E. and Perlman, P.: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay for immunoglobulin G, *Immunochemistry* 8, 871 (1971)

EVANS, G.A., Margulies, D.H., Shykind, B., Seldman, J.G. and Ozato, K.: Exon shuffling: mapping polymorphic determinants on hybrid mouse transplantation antigens, *Nature* 300, 755-757 (1980)

EY, P.L., Prowse, S.J. and Jenkin, C.R.: Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-sepharose, *Immunochemistry* 15, 429-436 (1978)

FINBERG, R., Burakoff, S.J., Cantor, H. and Benacerraf, B.: Biological significance of alloreactivity: T cells stimulated by Sendai virus-coated syngeneic cells specifically lyse allogeneic target cells, *PNAS* 75, 5145-5149 (1978)

FINK, P., Matis, L., McElligott, D., Bookman, M. and Hedrick, S.: Correlations between T-cell specificity and the structure of the antigen receptor, *Nature* 321, 219-226 (1986)

GALFRE, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. and Howard, J.C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines, *Nature* 266, 550-552 (1977)

GASTON, J.S.H., Rickinson, A.B. and Epstein, M.A.: Cross-reactivity of self-HLA-restricted Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes for allo-HLA determinants, *J.Exp.Med* 158, 1804-1821 (1983)

GATTI,R.A. and Leibold,W.: HLA-D typing with lymphoblastoid cell lines IV. Allelic relationships., *Tissue Antigens* 13, 35-44 (1979)

GECZY,A.F., McGuigan,L.E., Sullivan,J.S. & Edmonds J.P.: Cytotoxic T Lymphocytes against disease-associated determinant(s) in Ankylosing Spondylitis, *J. Exp. Med.* 164, 932-937 (1986)

GERSTEN,D.M. and Marchalonis,J.J.: A rapid, novel method for the solid-phase derivatization of IgG antibodies for immune-affinity chromatography, *J. Immunol. Methods* 24, 305-309 (1978)

GETZOFF,E.D., Geysen,H.M., Rodda,S.J., Alexander,H., Tainer,J.A. and Lerner,R.A.: Mechanisms of antibody binding to a protein, *Science* 235, 1191-1196 (1987)

GEYSEN,H.M., Tainer,J.A., Rodda,S.J., Mason,T.J., Alexander,H., Getzoff,E.D. and Lerner,R.A.: Chemistry of antibody binding to a protein, *Science* 235, 1184-1189 (1987)

GOLD,D.P., Puck,J.M. and Petty,C.L.: Isolation of cDNA clones encoding the 20K non-glycosylated polypeptide chain of the human T cell receptor/T3 complex, *Nature* 321, 431-434 (1986)

GREY,H.M., Kubo,R.T., Colon,S.M., Poulik,M.D.,Cresswell,P., Springer,T., Turner,M. and Strominger,J.L.: The small subunit of HLA-antigens is  $\beta$ 2-microglobuline., *J.Exp.Med.* 138, 1608-1612 (1973)

GUILLET,J.-G., Lai,M.-Z., Briner,T.J., Buus,S., Sette,A., Grey,H.M., Smith,J.A. and Geftter,M.L.: Immunological self, nonself discrimination, *Science* 235, 865-870 (1987)

GUILLET,J.-G., Lai,M.-Z., Briner,T.J., Smith,J.A. and Geftter,M.L.: Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens, *Nature* 324, 260-262 (1986)

GÜSSOW,D., Rein,R.S., Meljer,I., de Hoog,W., Seemann,G.H.A., Hochstenbach,F.M. and Ploegh,H.L.: Isolation, Expression, and the primary structure of HLA-Cw1 and HLA-Cw2 Genes: evolutionary aspects., *Immunogenetics* 26, 313-322 (1987)

HEDRICK,S.M., Cohen,D.L., Nielsen,E.A. and Davis,M.M.: Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane associated proteins, *Nature* 308, 149-153 (1984)

- HEESEMAN, J., Algermissen, B. and Laufs, R.: Genetically manipulated virulence of *Yersinia enterocolitica*. *Infection and Immunity* 46, 105-110 (1984)
- HOOD, L., Steinmetz, M. and Malissen, B.: Genes of the major histocompatibility complex of the mouse, *Ann. Rev. Immun.* 1, 529-568 (1983)
- HOOD, L., Steinmetz, M. and Goodenow, R.: Genes of the major histocompatibility complex, *Cell* 28, 685-687 (1982)
- ISH-HOROWICZ, D. and Burke, J.F.: Rapid and efficient cosmid vector cloning., *Nucl. Acid Res.* 9, 2989-2998 (1981)
- KEARNEY, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines, *J. Immunol.* 123, 1548-1550 (1979)
- KLEIN, J.: *Biology of the mouse histocompatibility complex*, Springer Verlag, Berlin (1975)
- KOURILSKY, P. and Claverie, J.-M.: The peptidic self model: A hypothesis on the molecular nature of the immunological self., *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 137D, 3-21 (1986)
- KÖHLER, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256, 495-497 (1975)
- KRATZIN, H., Yang, C.Y., Gotz, H., Pauly, E., Kolbel, S., Egert, G., Thinnies, F.P., Wernet, P., Altevogt, P. and Hilschmann, N.: Primärstruktur menschlicher Histokompatibilitätsantigene der Klasse II., *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chemie* 362, 1655-1669 (1981)
- KUON, W., Bevec, D., Dörner, C. and Weiss, E.: Analysis of HLA-B27 specific determinants by site-directed mutagenesis of the HLA-B27 gene, *In Vorbereitung*, (1987)
- LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685 (1970)
- LAKEY, E.K., Margollash, E., Flouret, G. and Pierce, S.: Peptides related to the antigenic determinant block T cell recognition of the native protein as processed by antigen presenting cells, *Eur. J. Immunol.* 16, 721-727 (1986)

LITTLEFIELD, J.W.: Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants, *Science* 145, 709-710 (1964)

MARYANSKI, J.L., Accolla, R.S. & Jordan, B.: H2-restricted recognition of cloned HLA class I gene products expressed in mouse cells, *J. Immunol.* 136, 4340-4347 (1986)

MARYANSKI, J.L., Pala, P., Corradin, G., Jordan, B.R. and Cerottini, J.-C.: H-2 restricted cytolytic T cells specific for HLA can recognize a synthetic HLA peptide, *Nature* 324, 578-579 (1986)

MESSING, J.: A multipurpose cloning system based on the single stranded DNA bacteriophage M13, *Rec.DNA Tech.Bull.*, NIH Publication 79-99 2, 43-48 (1979)

MESSING, J. and Vieira, J.: A new pair of M13 vectors for selecting either strand of double-digest restricted fragments., *Gene* 19, 269-276 (1982)

MESSING, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B. and Hofschneider, P.H.: Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle. Insertion of a nine II fragment of the lac regulatory region in the M13 replicative form in vitro, *PNAS* 74, 3642-3646 (1977)

MEUER, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F. and Reinherz, E.C.: Clonotypic structures involved in antigen specific human T cell function, *J.Exp.Med.* 157, 705-719 (1983)

MÜLLER, U., Jongeneel, C.V., Nedospasov, S.A., Fischer-Lindahl, K. and Steinmetz, M.: Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex, *Nature* 325, 265-267 (1987)

NEDWIN, G.W., Naylor, S.L., Sakaguchi, A.Y., Smith, D., Jarrett-Nedwin, J., Pennica, D., Goeddel, D.V. and Gray, P.W.: Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization, *Nucl.Acids.Res.* 13, 6361-6373 (1985)

NEDOSPASOV, S.A., Hirt, B., Shakhov, A.N., Dobrynin, V.N., Kawashima, E., Accolla, R.S. and Jongeneel, C.V.: The genes of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and lymphotoxin (TNF- $\beta$ ) are tandemly arranged on chromosome 17 of the mouse, *Nucl.Acids.Res.* 14, 7713-7727 (1986)

- NEEFJES,J.J., Breur-Vriesendorp,B.S., van Seventer G.A., Iványi,P. and Ploegh,H.L.: An improved biochemical method for the analysis of HLA-class I antigens. Definition of new class I subtypes, Hum. Immunol. 16, 169-181 (1986)
- NEEFJES,J.J., Doxladis,I., Stam,N.J., Beckers,C.J. & Ploegh,H.L.: An analysis of class I antigens of man and other species by one-dimensional IEF and immunoblotting, Immunogenetics 23, 164-171 (1986)
- OUCHTERLONY,O: Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis, Ann Arbor Science Publishers Inc (1970)
- OZATO,K., Evans,G.A., Shykind,B., Margulies,D.H. and Seidman,J.G.: Hybrid H-2 histocompatibility gene products assign domains recognized by alloreactive T-cells, PNAS 80 2040-2043 (1983)
- PARHAM,P., Clayberger,C., Zorn,S.L., Ludwig,D.S., Schoolnik,G.K. and Krensky,A.M.: Inhibition of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by peptides from the  $\alpha 2$  domain of HLA-A2., Nature 325, 626-628 (1987)
- PARHAM,P., Barnstable,C.J. & Bodmer,W.F.: Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C antigens, J. Immunol. 123, 342-349 (1979)
- PEL VAN,A., De Plaen,E. & Boon,T.: Selection of highly transfectable variant from mouse mastocytoma P815, Somat. Cell Genet. 11, 467-475 (1985)
- PIMLOTT,N.J.G. and Miller,R.G.: The use of tunicamycin to study the role of cell surface oligosaccharides in lymphocyte recognition, The Journal of Immunol. 137, 2455-2459 (1986)
- PLOEGH,H.L., Cannon,L.E., and Strominger,J.L.: Cell-free translation of the mRNAs for the heavy and light chains of HLA-A and HLA-B-antigens, PNAS 76, 2273-2277 (1979)
- REILLY,E.B., Kranz,D.M., Tonegawa,S. and Eisen,H.N.: A functional  $\gamma$  gene formed from known  $\gamma$ -gene segments is not necessary for antigen-specific responses of murine cytotoxic T lymphocytes, Nature 321, 878-880 (1986)

RETH,M., Hämmerling,G.J. and Rajewsky,K.: Analysis of the repertoire of anti-NP-antibodies in C57Bl/6 mice by cell fusion. I. Characterization of antibody families in the primary and hyperimmune response, *Eur.J.Immunol* 8, 393-400 (1978)

RIEBER,E.P.: Störungen der Immunantwort bei LAS und AIDS, *Münch. Med. Wschr.* 128, 463-466 (1986)

ROSENTHAL,A.S., Barcinski,M.A. and Blake,J.T.: Determinant selection is a macrophage dependent immune response gene function, *Nature* 267, 156 (1977)

RUPP,F., Frech,G., Hengartner,H., Zinkernagel,R.M. and Joho,R.: No functional  $\gamma$ -transcripts detected in an alloreactive cytotoxic T cell clone, *Nature* 321, 876-878 (1986)

SANGER,F., Nicklen,S. and Coulson,A.R.: DNA sequencing with chain terminating inhibitors., *PNAS* 74, 5463-5467 (1977)

SCHENDEL,D.J., Wank,R. and Dupont,B.: Cell-mediated lympholysis: examination of HLA genetic fine structure and complementation using cytotoxic lymphocytes, *Eur. J. Immunol.* 8, 634-640 (1978)

SHERWOOD,R.A., Brent,L. and Rayfield,L.S.: Presentation of alloantigens by host cells, *Eur. J. Immunol.* 16, 569- 574 (1986)

SIMS,J.E., Tunnacliff,A., Smith,W.J. and Rabbits,T.H.: Complexity of human T cell antigen receptor  $\beta$  chain constant and variable region genes, *Nature* 312, 541-544 (1984)

SOMEREN VAN,H., Westerveld,A., Hagemajer,A., Mees,J.R., Meera Khan,P. and Zaalberg,O.B.: Human antigen and enzyme markers in man-chinese hamster somatic cell hybrids: evidence for synteny between the HLA-A, PGMe, ME1 and IPO-B loci., *PNAS* 71, 982-966 (1974)

SPOUGE,J.L., Guy,H.R., Cornette,J.L., Margalit,H., Cease,K., Berzofsky,J.A. and DeLisi,C.: Strong conformational propensities enhance T-cell antigenicity, *J. Immunol.* 138, 204-212 (1987)

STAM,N.J., Spits,H. and Ploegh,H.L.: Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products., *J. Immunol.* 137, 2299-2306 (1986)

STANLEY,K.K. and Luzon,J.P.: Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: Identification of cDNA clones coding for human liver proteins, *The EMBO Journal* 3, 1429-1434 (1984)

STANSSENS,P., Remaut,E. and Fiers,W.: Alterations upstream from the Shine-Dalgarno region and their effect on bacterial gene expression., *Gene* 36, 211-223 (1985)

SZÖTS,H., Riethmüller,G., Weiss,E. and Meo,T.: Complete sequence of HLA-B27 cDNA identified through the characterization of structural markers unique to the HLA-A,-B and -C allelic series, *PNAS* 83, 1428-1432 (1986)

THURAU,S.R., Wildner,G., Kuon,W., Weiss,E. and Riethmüller,G.: In Vorbereitung

TILKIN,A.F., Michon,J., Juy,D., Kayibanda, M., Henin,Y., Sterkers,G., Betuel,H., and Lévy, J.P.: Autoreactive T cell clones of MHC class II specificities are produced during responses against foreign antigens in man, *The Journal of Immunology* 138, 674-679 (1987)

TOWBIN,H., Staehelin,T. and Gordon,J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *PNAS* 76, 4350-4354 (1979)

TOWNSEND,A.R.M., Bastin,J., Gould,K. and Brownlee,G.G.: Cytotoxic T lymphocytes recognize Influenza haemagglutinin that lacks a signal sequence, *Nature* 324, 575-577 (1986)

TOWNSEND,A.R.M., Rothbard,J., Gotch,F.M., Bahadur,G., Wraith,D. and McMichael,A.J.: The epitopes of Influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides, *Cell* 44, 959-968 (1986)

UPFOLD,L.I., Sullivan,J.S. & Geczy,A.F.: Biochemical studies on a factor isolated from Klebsiella K43-BTS1 that cross-reacts with cells from HLA-B27 positive patients with Ankylosing Spondylitis, *Hum. Immunol.* 17, 224-238 (1986)

UPFOLD, L.I., Sullivan, J.S., Prendergast, J.K. & Geczy, A.P.: HLA-B27: Speculations on the nature of its involvement in Ankylosing Spondylitis, *Prog. Allergy* 36, 177-189 (1985)

VASILOV, R.G., Hahn, A., Mölders, H., Van Rood, J.J., Breuning, M. and Ploegh, H.L.: Analysis of human class I antigens by two-dimensional gel electrophoresis, *Immunogenetics* 17, 333-356 (1983)

WALKER, L.E., Ketler, T.A., Houghten, R.A., Schulz, G., Cherisl, A. and Reisfeld, D.R.A.: Human major histocompatibility complex class I antigens: residues 61-83 of the HLA-B7 heavy chain specify an alloreactive site, *PNAS* 82, 539-542 (1985)

YAGÖE, J., White, J., Coleclough, C., Kappler, J., Palmer, E. and Marrack, P.: The T cell receptor: The  $\alpha$  and  $\beta$  chains define idiotypic and antigen and MHC specificity, *Cell* 42, 81-87 (1985)

YANAGI, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S.P., Aleksander, I. and Mak, T.: A human T cell specific cDNA clone that encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains, *Nature* 308, 146 (1984)

ZINKERNAGEL, R.M. and Doherty, P.C.: Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system, *Nature* 248, 701-702 (1974)

ZINKERNAGEL, R.M. and Doherty, P.C.: Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis, *Nature* 251, 547-548 (1974)

## VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN

|         |                                                                                                      |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1: | Zelluläre und humorale Interaktionen bei der<br>Ausbildung einer Immunantwort                        | 3  |
| Abb. 2: | Modell der Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor                                                | 5  |
| Abb. 3: | Schematische Darstellung der HLA-KI.I und KI.II-<br>Moleküle in der Zellmembran                      | 7  |
| Abb. 4: | Exon-Inton-Struktur eines HLA-A-Gens und<br>Übersetzung in Protein                                   | 8  |
| Abb. 5: | Genkarte des Vektors pEx1                                                                            | 12 |
| Abb. 6: | Restriktionskarte des B27-cDNS-Klons pB1                                                             | 13 |
| Abb. 7: | Schematische Darstellung der Subklonierung von<br>B27-cDNS-Abschnitten in den Expressionsvektor pEx1 | 14 |
| Abb. 8: | Schematische Darstellung der Umklonierung von<br>B27-cDNS-Abschnitten aus pEx1 in pEx10              | 15 |
| Abb. 9: | Schematische Darstellung der Umklonierung der<br>B27-Subklone von pEx10 in pPLcAT10                  | 16 |
| Abb.10: | 10% SDS-PAGE mit $\beta$ Galaktosidase-Fusionsproteinen                                              | 19 |
| Abb.11: | 12% SDS-PAGE mit MS2-Polymerase-Fusionsproteinen                                                     | 19 |
| Abb.12: | EPICS-Analyse                                                                                        | 24 |
| Abb.13: | Oberflächenfluoreszenz auf Zelllinien                                                                | 27 |
| Abb.14: | Western Blot                                                                                         | 29 |
| Abb.15: | Isoelektrische Fokussierung                                                                          | 30 |
| Abb.16: |                                                                                                      | 36 |
| Abb.17: |                                                                                                      | 37 |
| Abb.18: |                                                                                                      | 38 |
| Abb.19: |                                                                                                      | 39 |
| Abb.20: |                                                                                                      | 41 |
| Abb.21: | Inhibition der B27-spezifischen Zytotoxizität<br>durch Fusionsproteine und monoklonale Antikörper    | 44 |
| Abb.22: | Inhibition der Zytotoxizität der T-Zell-Linie WM                                                     | 45 |
| Abb.23: | Modell zur Selbst/Fremd-Unterscheidung von T-Helfer-Zellen                                           | 60 |
| Tab. 1: | Bindungstest der monoklonalen Antikörper an die Fusionsproteine                                      | 22 |
| Tab. 2: | Numerische Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität                                           | 26 |
| Tab. 3: |                                                                                                      | 32 |
| Tab. 4: |                                                                                                      | 33 |
| Tab. 5: |                                                                                                      | 34 |

## DANKSAGUNGEN

Frau Prof. Dr. D.J. Schendel danke ich besonders für die vielen interessanten Diskussionen und Anregungen sowie für das stets große Interesse, das sie meiner Arbeit entgegenbrachte und wodurch sie mich in jeder Hinsicht sehr unterstützt hat. Ich danke ihr auch sehr herzlich für viele Blutspenden und Materialien, die sie mir zur Verfügung gestellt hat.

Frau Dr. E. Weiss danke ich sehr dafür, daß ich mich unter ihrer Anleitung in ihrer Arbeitsgruppe in die molekularbiologischen Techniken einarbeiten durfte. Auch ihr bin ich sehr dankbar für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Ideen und Ratschläge, die mir sehr weitergeholfen haben.

Herrn Dr. R. Wank und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die HLA-Typisierungen meiner Blutspender.

Herrn Prof. Dr.G. Riehmüller danke ich für seine Unterstützung und die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut, auch für die Möglichkeit, neuen Ideen nachzugehen und durch Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen im Institut neue Technologien zu erlernen.

Herrn Prof. Dr. H. Cleve danke ich für die bereitwillige Übernahme der Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.

Allen Mitgliedern der Instituts für Immunologie gilt mein Dank für ihre Kollegialität und Hilfsbereitschaft, vor allem den Arbeitsgruppen im vierten Stockwerk, besonders der von Frau Dr. E.Weiss sowie auch den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. D.J.Schendel und Herrn Dr.R.Wank. Namentlich danken möchte ich M.Diedrichs, T.Schlunck und E.Lederer.

Mein Dank gilt auch allen Blutspendern und nicht zuletzt R.D.Knies und S.R.Thurau für ihre Unterstützung bei meinem Kampf mit der Textverarbeitung.

# LEBENS LAUF

Name: Gerhild Wildner  
wohnhaft in: 8000 München 19, Rupprechtstr.8a  
Geburtstag/-ort: 26.6.1958 in Graz/Österreich  
Übersiedlung in die  
BR Deutschland: 17.6.1961  
Schulbildung: 1964 - 1967 Gemeinschaftsschule  
Herzogstraße, Opladen  
1967 Aufnahme in das städt.  
Ina-Seidel-Gymnasium, Leverkusen-Opladen  
1976 Reifeprüfung  
Studium: Biologiestudium an der Universität zu  
Köln ab Wintersemester 1976/77  
Diplomarbeit: "Isolierung und Charakterisierung monoklonaler,  
anti-Idiotypischer Antikörper gegen eine  
somatische Immunglobulinvariante"  
Betreuer: Prof. Dr. K. Rajewsky  
Ort der Durchführung: Institut für Genetik der Universität Köln  
Diplom: 3.5.1982  
Promotion: Mai 1982 Beginn der Promotion am  
Institut für Immunologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität, München  
Betreuer: Prof. Dr. G. Riehmüller  
Institut für Immunologie der LMU München









